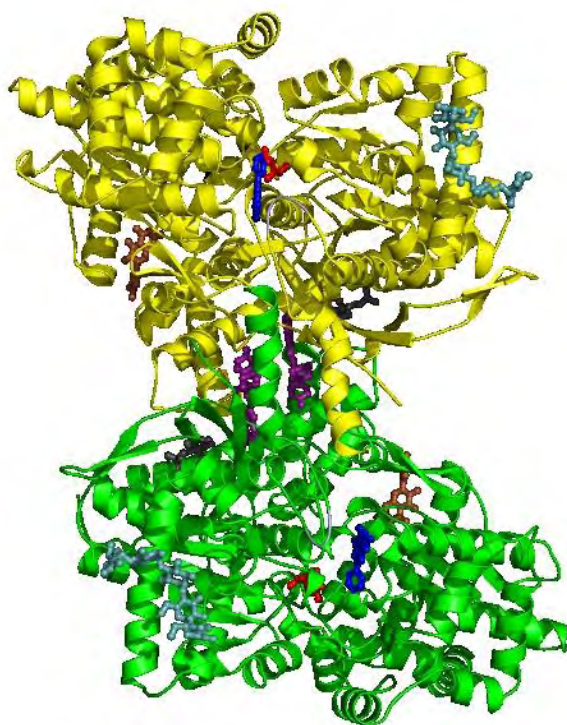




ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ  
ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ**  
***“ Βιοτεχνολογία - Ποιότητα Διατροφής και Περιβάλλοντος ”***

**ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΥΠΟΓΛΥΚΑΙΜΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ  
ΠΑΡΑΠΡΟΙΟΝΤΩΝ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΡΟΔΙΟΥ ΜΕ ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ  
ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΕΣ ΩΣ ΕΝ ΔΥΝΑΜΕΙ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΗΣ  
ΦΩΣΦΟΡΥΛΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ**



**ΨΑΧΟΥΛΑ ΧΑΡΙΚΛΕΙΑ**

**ΛΑΡΙΣΑ 2015**

ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΥΠΟΓΛΥΚΑΙΜΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ  
ΠΑΡΑΠΡΟΙΟΝΤΩΝ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΡΟΔΙΟΥ ΜΕ ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ  
ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΕΣ ΩΣ ΕΝ ΔΥΝΑΜΕΙ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΗΣ  
ΦΩΣΦΟΡΥΛΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ

ASSESSMENT OF EXTRACTS FROM BYPRODUCTS OF THE  
POMEGRANATE INDUSTRIAL PROCESSING FOR  
HYPOGLYCAEMIC ACTIVITY BY BIOCHEMICAL METHODS AS  
POTENTIAL INHIBITORS OF GLYCOGEN PHOSPHORYLASE

## **Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:**

- **Δρ. Λεωνίδας Δ. Δημήτριος (επιβλέπων)**

Αναπληρωτής καθηγητής Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

- **Δρ. Ψαρρά Άννα-Μαρία**

Επίκουρος καθηγήτρια Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

- **Δρ. Σκαμνάκη Βασιλική**

Λέκτορας Βιοχημείας – Μεταβολισμού του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία, εκπονήθηκε στο *εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας* του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, κατά το χρονικό διάστημα Φεβρουάριος 2015 - Ιούνιος 2015, υπό την επίβλεψη του Δρ. Λεωνίδα Δημήτρη.

Χωρίς την παρουσία, την υποστήριξη και την ανεκτικότητα κάποιων ανθρώπων δεν θα ήταν δυνατή η υλοποίηση αυτής της μεταπτυχιακής διατριβής.

Τις θερμές μου ευχαριστίες αποδίδω στον Δρ. Λεωνίδα Δημήτριο, αναπληρωτή καθηγητή Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για την ανάθεση της διπλωματικής εργασίας και την εμπιστοσύνη του στο πρόσωπο μου. Η επιστημονική, πνευματική και ηθική υποστήριξη που μου παρείχε καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της εργασίας, υπήρξε πολύτιμη.

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω τους υποψήφιους διδάκτορες του *εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας*. Σε μια πράξη αναγνώρισης της συνεισφοράς του στην περάτωση της εργασίας, ευχαριστώ τον υποψήφιο διδάκτορα Στραβοδήμο Γεώργιο, για τις πολύτιμες συμβουλές και γνώσεις που μου μετέδωσε σε θεωρητικό επίπεδο αλλά και κατά τη διάρκεια της εκτέλεσης του πειραματικού μέρους, καθώς και για τη στήριξή του. Ακόμη, ευχαριστώ την υποψήφια διδάκτωρ Καντσάνδη Αναστασία για την καθοδήγηση ως προς τη σωστή διεκπεραίωση των πειραματικών διαδικασιών.

Σε μια πράξη ευγνωμοσύνης, θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς τους γονείς μου και την αδελφή μου, για τη διαρκή πίστη τους στις δυνατότητές μου αλλά και για την οικονομική και ηθική στήριξη που μου παρείχαν στη ζωή μου.

Τέλος, αισθάνομαι την υποχρέωση να ευχαριστήσω ακόμη όλα τα μέλη του *εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας* καθώς και όλους όσους συνέβαλαν άμεσα ή έμμεσα στην διεκπεραίωση της εργασίας αυτής.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη	7
Abstract	9

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1. ΣΑΚΧΑΡΩΔΗΣ ΔΙΑΒΗΤΗΣ

1.1 Ιστορική αναδρομή του Diabetes Mellitus	11
1.2 Γενικά για τον Σακχαρώδη Διαβήτη	12
1.3 Κλινικές κατηγορίες του Σακχαρώδη Διαβήτη	16
1.3.1 Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου I	17
1.3.2 Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου II	18
1.3.3 Σακχαρώδης Διαβήτης κύησης	21
1.3.4 Ειδικές μορφές Σακχαρώδους Διαβήτη	21
1.4 Ομοιόσταση γλυκόζης και ο ρόλος της ινσουλίνης	22
1.5 Το ρυθμιστικό σύστημα γλυκόζης-ινσουλίνης	23
1.6 Ινσουλίνη	25
1.6.1 Χημική δομή, σύνθεση και απελευθέρωση ινσουλίνης	25
1.6.2 Φυσιολογικός ρόλος της ινσουλίνης	28
1.6.3 Δράση της ινσουλίνης στο μεταβολισμό	29
1.7 Γλυκαγόνη	33
1.7.1 Χημική δομή, σύνθεση και απελευθέρωση γλυκαγόνης	33
1.7.2 Δράση της γλυκαγόνης στο μεταβολισμό	34
1.8 Μηχανισμός δράσης ινσουλίνης-γλυκαγόνης στον έλεγχο των επιπέδων της γλυκόζης του αίματος	36

### 2. ΒΑΣΙΚΕΣ ΓΝΩΣΕΙΣ

2.1 Γλυκόζη	38
2.2 Γλυκογόνο	41
2.2.1 Αποικοδόμηση γλυκογόνου	42
2.2.2 Ο ρόλος της φωσφορικής πυριδοξάλης στη φωσφορολυτική διάσπαση του γλυκογόνου	43

### 3. ΦΩΣΦΟΡΥΛΑΣΗ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ

3.1 Γενικά	47
3.2 Αλλοστερικές αλληλεπιδράσεις	49
3.3 Κρυσταλλική δομή της GP	57
3.4 Κέντρα σύνδεσης της GP	59
3.4.1 Το κέντρο φωσφορυλίωσης της Ser14	59
3.4.2 Το αλλοστερικό κέντρο	60
3.4.3 Το καταλυτικό κέντρο	60
3.4.4 Το κέντρο σύνδεσης ολιγοσακχαριτών	61
3.4.5 Το κέντρο αναστολής	61

3.4.6 Το νέο αλλοστερικό κέντρο	62
3.5 Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου ως στόχος υπογλυκαιμικών φαρμάκων	63
3.6 Φυτικά εκχυλίσματα ως εν δυνάμει αντιδιαβητικά σκευάσματα	66
3.6.1 Εκχυλίσματα ροδιού	66

#### **4. ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΕΝΖΥΜΙΚΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΩΝ**

4.1 Αρχές ενζυμικής κινητικής	69
4.2 Αναστολή ενζυμικών αντιδράσεων	72

### **ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

5.1 Απομόνωση φωσφορυλάσης b του γλυκογόνου από σκελετικούς μυς κουνελιού	77
5.2 Κινητική μελέτη της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου	81
5.2.1 Προσδιορισμός της ειδικής δραστηριότητας της GPb	81
5.2.2 Προσδιορισμός σταθεράς Michaelis-Menten (KM) της GPb	82
5.3 Προσδιορισμός IC <sub>50</sub> αναστολέα	83
5.3.1 Παρασκευή διαλύματος GPb-γλυκογόνου	84
5.3.2 Παρασκευή διαλύματος υποστρωμάτων	85
5.3.3 Εκτέλεση του πειράματος	86
5.4 Προσδιορισμός ορθοφωσφορικών ιόντων	87
5.4.1 Μέθοδος ασκορβικού οξέος	87
5.5 Παρασκευή τυφλών	88
5.6 Επεξεργασία δεδομένων κινητικών πειραμάτων-πρόγραμμα Grafit	89
Σκοπός της εργασίας	90

### **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

6.1 Αποτελέσματα απομόνωσης της GPb	93
6.2 Αποτελέσματα κινητικών πειραμάτων	94
6.2.1 Κινητική μελέτη της φωσφορυλάσης b του γλυκογόνου	94
6.2.2 Κινητική μελέτη εκχυλισμάτων παραπροϊόντων επεξεργασίας ροδιού	95

### **ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ** 99

### **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ** 100

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

### ΙΣΤΟΡΙΚΟ:

Ο Σακχαρώδης Διαβήτης είναι μια νοσολογική οντότητα η οποία χαρακτηρίζεται ως μία σύγχρονη επιδημία, αποτελώντας μείζονα απειλή για τη δημόσια υγεία σε παγκόσμια κλίμακα. Θεωρείται μία από τις σημαντικότερες αιτίες νοσηρότητας και θνησιμότητας ανά την υφήλιο. Πρόκειται για μεταβολική διαταραχή η οποία χαρακτηρίζεται από υψηλά επίπεδα γλυκόζης στο αίμα (υπεργλυκαιμία) λόγω διαταραχής στο μεταβολισμό της γλυκόζης. Η υπεργλυκαιμία αποτελεί απόρροια ελαττωματικής έκκρισης της ινσουλίνης από το πάγκρεας ή/και ανεπαρκούς ευαισθησίας των κυττάρων-στόχων στην ινσουλίνη. Η θεραπεία κατά του διαβήτη αποσκοπεί στη διατήρηση των επιπέδων της γλυκόζης του αίματος σε φυσιολογικά επίπεδα. Για το σκοπό αυτό, ένζυμα και υποδοχείς που εμπλέκονται στη ρύθμιση των επιπέδων της γλυκόζης χρησιμοποιούνται ως μοριακοί στόχοι για την εύρεση μορίων που εκλεκτικά θα τα ενεργοποιούν ή θα τα αναστέλουν, και θα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως εν δυνάμει αντι-υπεργλυκαιμικοί παράγοντες. Ένας από τους σημαντικότερους μοριακούς στόχους για το σχεδιασμό νέων αντι-υπεργλυκαιμικών φαρμάκων είναι το ένζυμο ηπατική φωσφορυλάση του γλυκογόνου.

### ΜΕΘΟΔΟΣ:

Στη παρούσα διατριβή, απομονώθηκε το ένζυμο μυϊκή φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GPb) από σκελετικούς μύες κουνελιού, το οποίο χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη, μέσω κινητικών πειραμάτων, της επίδρασης των εκχυλισμάτων ροδιού, στην ενζυμική του δραστηριότητα. Η ηπατική φωσφορυλάση του γλυκογόνου (LGP) είναι 80 % ομόλογη ως προς την αμινοξική ακολουθία με την μυϊκή GP, όμως η ομολογία μεταξύ των δυο ενζύμων είναι 100% στην περιοχή του ενεργού κέντρου. Ειδικότερα, η κινητική μελέτη πραγματοποιήθηκε προς την κατεύθυνση σύνθεσης του γλυκογόνου.

### ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ και ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ:

Η κινητική μελέτη έδειξε ότι ορισμένα από αυτά τα εκχυλίσματα παρουσιάζουν μείωση της δραστηριότητας του ενζύμου κατά 50% ( $IC_{50}$ ), σε σημαντικά χαμηλές συγκεντρώσεις. Τα δύο από τα τρία εκχυλίσματα ροδιού που μελετήθηκαν δείχνουν ικανά να αναστείλουν τη GPb σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις, με το δείγμα  $\Xi 3$  να εμφανίζει  $IC_{50} = 8,67 \pm 0,21 \mu g/ml$ , και το δείγμα ΠΛ να έχει  $IC_{50} = 11,05 \pm 0,77 \mu g/ml$ . Το δείγμα ΠΕ βρέθηκε να έχει  $IC_{50} = 27,15 \pm 1,14 \mu g/ml$ , γεγονός που δηλώνει αναστολή του ενζύμου σε συγκέντρωση σχεδόν τριπλάσια του  $\Xi 3$ . Η παρούσα μελέτη μπορεί να αποτελέσει αφετηρία για την ανακάλυψη νέων φυσικών αντι-υπεργλυκαιμικών παραγόντων.

**Λέξεις κλειδιά:** Σακχαρώδης Διαβήτης, μεταβολισμός γλυκογόνου, παραπροϊόντα ροδιού, φωσφορυλάση του γλυκογόνου, κινητικά πειράματα



## ABSTRACT

### BACKGROUND:

Diabetes mellitus is a disease characterized as a modern epidemic, constituting a major threat for public health on a global scale. It is considered as one of the most important causes of morbidity and mortality worldwide. It is a metabolic disorder characterized by high blood glucose levels (hyperglycemia) due to a disturbance in glucose metabolism. Hyperglycemia is a consequence of defective secretion of insulin from the pancreas and/or of insufficient sensitivity to insulin target cells. Treatment against diabetes aims to maintain the levels of plasma glucose to normal levels. For this purpose, enzymes and receptors involved in the regulation of blood glucose levels are used as molecular targets in order to discover new molecules which will selectively activate or inhibit them, and can be used as potential antihyperglycemic agents. One of the most important molecular targets for the design of new antihyperglycemic drugs is the hepatic glycogen phosphorylase.

### METHOD:

In the present study, the enzyme muscle glycogen phosphorylase (GPb) was isolated and purified from rabbit skeletal muscle, and used for kinetic experiments, to assess the inhibitory potential of pomegranate extracts, on its enzyme activity. Liver glycogen phosphorylase (LGP) and muscle GP share 80% identity in the amino acid sequence, and 100% at the active site. Kinetic experiments were performed in the direction of glycogen synthesis.

### RESULTS and CONCLUSIONS:

The kinetic study showed that some of these extracts display low  $IC_{50}$  values. Two of the three pomegranate extracts that were studied displayed significantly low  $IC_{50}$  values, with samples X3 and PL showing  $IC_{50} = 8.67 \pm 0.21 \mu\text{g/mL}$ , and  $IC_{50} = 11.05 \pm 0.77 \mu\text{g/mL}$ , respectively. Sample PE had  $IC_{50} = 27.15 \pm 1.14 \mu\text{g/mL}$ , indicating that almost three times more concentration of the sample is required to produce the same inhibitory effect as sample X3. This study can be a starting point for the discovery of new natural antihyperglycemic agents.

**Keywords:** Diabetes mellitus, Glycogen metabolism, Pomegranate byproducts, Glycogen Phosphorylase, kinetic experiments

**1<sup>ο</sup> ΜΕΡΟΣ**

**ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

## 1.1 ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ ΤΟΥ Diabetes Mellitus (DM):

Η ονομασία «διαβήτης» προέρχεται από τη Λατινική “*diabētēs*”, η οποία με τη σειρά της προέρχεται από την αρχαία ελληνική «διαβαίνειν». Η πρώτη πλήρης κλινική περιγραφή του «διαβήτη» με συμπτώματα όπως πολυδιψία, πολυουρία και απώλεια βάρους, δόθηκε από τον αρχαίο Έλληνα ιατρό Αρεταίο από την Καππαδοκία κατά τον 2<sup>ο</sup> αιώνα μ.Χ., ο οποίος σημείωσε την υπερβολική ποσότητα των ούρων που διέρχονται από τους νεφρούς κι έτσι έδωσε στη νόσο το όνομα «διαβήτης» [Dallas & John, 2011]. Η λέξη «σακχαρώδης» προέρχεται από την κλασική λατινική “*mellitus*”, που σημαίνει «γλυκό σαν μέλι».

Ο Thomas Willis (1621-1675) στο Πανεπιστήμιο της Οξφόρδης πρόσθεσε τη λέξη «σακχαρώδης» στη λέξη «διαβήτης» ως ονομασία για την ασθένεια, όταν πρόσεξε ότι τα ούρα των διαβητικών ασθενών είχαν μια γλυκιά γεύση (γλυκοζουρία). Το 1776 ο Matthew Dobson επιβεβαίωσε ότι η γλυκιά γεύση στα ούρα και το αίμα προέρχεται από την περίσσεια ενός είδους σακχάρου [Dobson M., 1776]. Το 1815 ο M.Chelreul τελικά αποδεικνύει ότι το σάκχαρο των ούρων είναι η γλυκόζη [Saudi Med J., 2002]. Κατά τον 18<sup>ο</sup> αιώνα και στις αρχές του 19<sup>ου</sup> έγινε αποδεκτό ότι η γλυκοζουρία αποτελεί διαγνωστικό κριτήριο των διαβητικών ασθενών και η νόσος αναγνωρίστηκε ως μεταβολική διαταραχή.

Ο Claude Bernard το 1857, Γαλλία διατύπωσε τη θεωρία ότι ο διαβήτης προκαλείται από γλυκογονόλυση του ηπατικού γλυκογόνου, το οποίο εκκρίνει γλυκές ουσίες στο αίμα, υποθέτοντας πως η υπερβολική έκκρισή τους προκαλεί διαβήτη [Savona-Ventura C., 2002]. Η ανακάλυψη του ρόλου του παγκρέατος στο διαβήτη αποδίδεται γενικά στους Joseph von Mering και Oskar Minkowski, το 1889, Αυστρία [Von Mehring J & Minkowski O., 1890].

Αν και ο διαβήτης έχει αναγνωριστεί ως ασθένεια από την αρχαιότητα, η παθογένειά του κατανοήθηκε πειραματικά περίπου από το 1900. [Patlak M., 2002]. Το 1910, ο Sir Edward Albert Sharpey-Schafer πρότεινε ότι οι άνθρωποι με διαβήτη ήταν ελλειπείς σε μια ενιαία χημική ουσία που φυσιολογικά παράγεται από το πάγκρεας, καλώντας την ουσία αυτή ινσουλίνη, από το λατινικό “*insula*”, αναφερόμενος στην ορμόνη που παράγεται από τα νησίδια του Langerhans στο πάγκρεας. Ο ενδοκρινικός ρόλος του παγκρέατος στο μεταβολισμό, και μάλιστα η ύπαρξη της ινσουλίνης, διευκρινίστηκε περαιτέρω το 1921, από τους Sir Frederick Banting Grant και Charles Herbert Best [Banting F.G. et al., 1991]. Αυτή η ανακάλυψη αποτέλεσε τη βάση για την απομόνωσης της ινσουλίνης και την κλινική της χρήση ως θεραπεία της νόσου [Leonid Poretsky, 2009]. Ο Banting τιμάται από την Παγκόσμια Ημέρα για το Διαβήτη, 14 Νοεμβρίου, ενώ του απονεμήθηκε το βραβείο Νόμπελ το 1923.

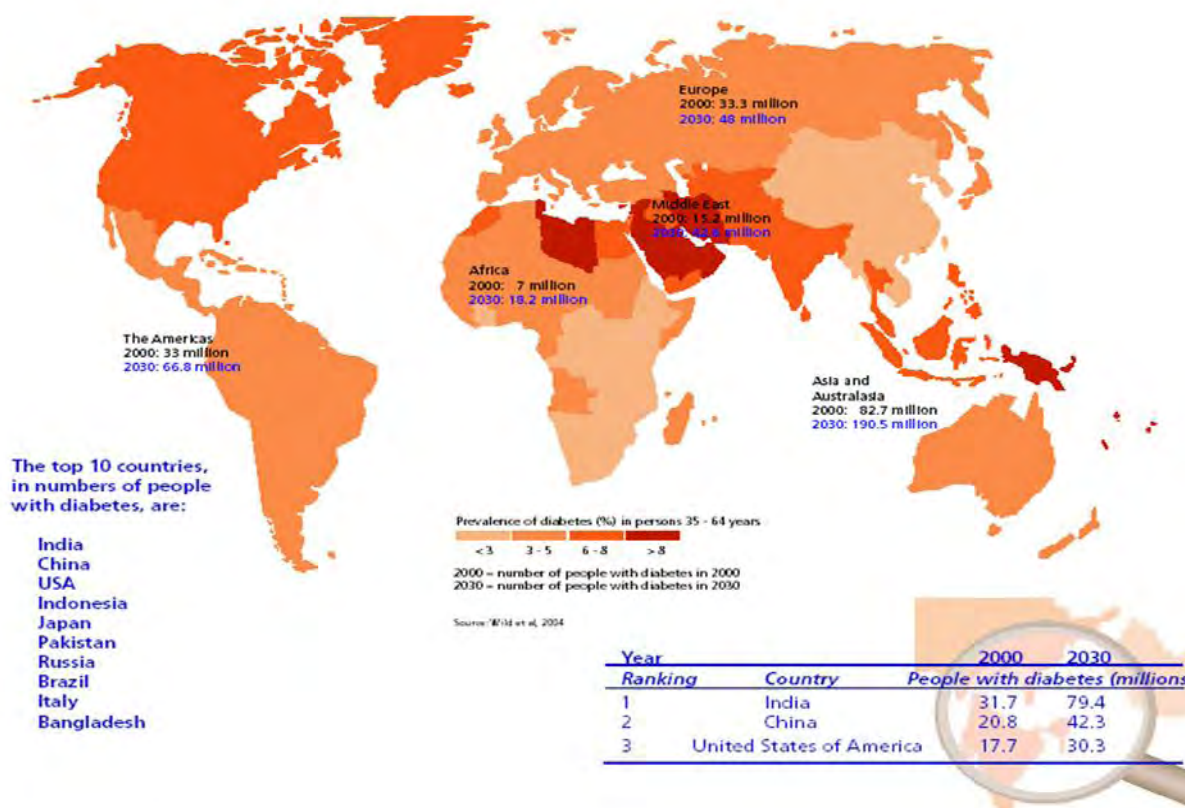
## 1.2 ΓΕΝΙΚΑ ΓΙΑ ΤΟΝ ΣΑΚΧΑΡΩΔΗ ΔΙΑΒΗΤΗ:

Ο Σακχαρώδης Διαβήτης (ΣΔ) είναι μια νοσολογική οντότητα η οποία χαρακτηρίζεται ως μία σύγχρονη επιδημία, αποτελώντας μείζονα απειλή για τη δημόσια υγεία σε παγκόσμια κλίμακα. Θεωρείται χρόνια νόσος, η οποία μπορεί να παραμένει σιωπηλή και ασυμπτωματική για μεγάλο χρονικό διάστημα, και μια από τις σημαντικότερες αιτίες νοσηρότητας και θνησιμότητας ανά την υφήλιο. Πρόκειται για μεταβολική διαταραχή πολλαπλής αιτιολογίας, η οποία χαρακτηρίζεται από χρόνια υπεργλυκαιμία λόγω διαταραχής στο μεταβολισμό κυρίως της γλυκόζης, των υδατανθράκων, των πρωτεϊνών και των λιπιδίων γενικότερα. Η υπεργλυκαιμία, αυξημένα επίπεδα σακχάρου στο αίμα, αποτελεί απόρροια ελαττωματικής έκκρισης της ινσουλίνης από το πάγκρεας, ή/και ανεπαρκούς απόκρισης των διάφορων ιστών-στόχων σε αυτή. Η μειωμένη ανταπόκριση στην ινσουλίνη των κυττάρων-στόχων, μπορεί να οφείλεται σε μείωση του διαθέσιμου αριθμού υποδοχέων ινσουλίνης, σε μειωμένη χημική συγγένεια μεταξύ ινσουλίνης και υποδοχέων ή σε κάποια ενδοκυτταρική ανωμαλία [Φυσιολογία Σμοκοβίτη, 2004]. Οι επιπτώσεις του Σακχαρώδους Διαβήτη περιλαμβάνουν μακροπρόθεσμες βλάβες, δυσλειτουργία και ανεπάρκεια διαφόρων οργάνων όπως οι νεφροί, τα μάτια, το καρδιαγγειακό σύστημα, το νευρικό σύστημα και τα αιμοφόρα αγγεία [WHO, 1999].

Οι επιπλοκές του ΣΔ χωρίζονται σε μικροαγγειακές και μακροαγγειακές. Οι μικροαγγειακές επιπλοκές περιλαμβάνουν τη διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια που είναι η κύρια αιτία οπτικής αναπηρίας και τύφλωσης [WHO, 2012], τη διαβητική νεφροπάθεια που οδηγεί σε νεφρική ανεπάρκεια και τη νευροπάθεια ως αποτέλεσμα της υπεργλυκαιμίας και της μειωμένης ροής αίματος στα νεύρα, με αποτέλεσμα διαβητικό πόδι και σοβαρές λοιμώξεις που οδηγούν σε έλκη των κάτω άκρων και την ενδεχόμενη ανάγκη για ακρωτηριασμό [WHO, 2011]. Οι μακροαγγειακές επιπλοκές περιλαμβάνουν καρδιαγγειακές επιπλοκές όπως αθηροσκλήρωση και καρδιαγγειακή νόσο, αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο και ανεπάρκεια της ροής του αίματος στα πόδια [Diabetologia, 2001]. Η δυσλιπιδαιμία, η υπέρταση και η υπογλυκαιμία αναφέρονται ως συνυπάρχουσες παθήσεις. Ο συνολικός κίνδυνος θανάτου μεταξύ των ατόμων με ΣΔ είναι τουλάχιστον διπλάσιος από ότι των ατόμων χωρίς διαβήτη [Diabetes Care, 2005]. Υπάρχουν στοιχεία από μεγάλες τυχαιοποιημένες ελεγχόμενες μελέτες, ότι ένας καλός μεταβολικός-γλυκαιμικός έλεγχος των διαβητικών ασθενών μπορεί να καθυστερήσει την έναρξη και την πρόοδο αυτών των επιπλοκών.

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO), ο επιπολασμός του Σακχαρώδους Διαβήτη για όλες τις ηλικιακές ομάδες σε όλο τον κόσμο εκτιμάται σε 2,8% το 2000 και 4,4% το 2030. Το 2000 η εξάπλωση της νόσου

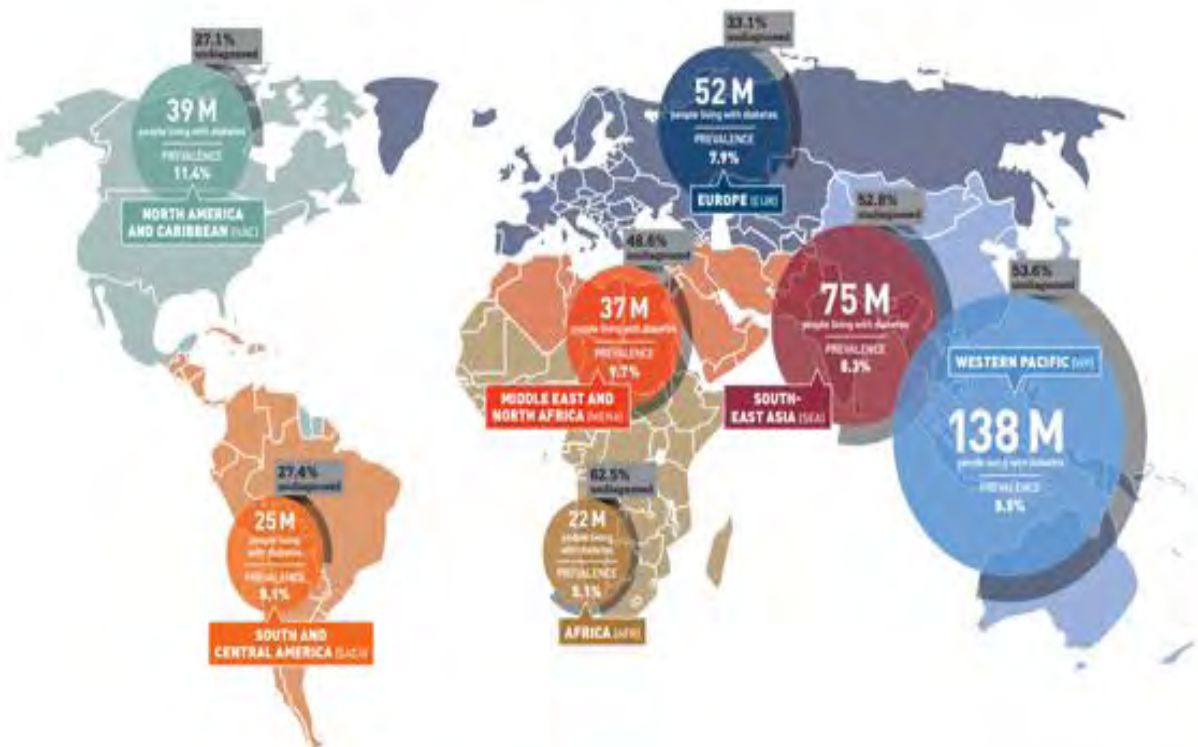
διεθνώς άγγιζε τα 171 εκατομμύρια άτομα, ενώ ο αριθμός αυτός προβλέπεται να αυξηθεί σε 366 εκατομμύρια μέχρι το 2030. Αυτή η ραγδαία ανερχόμενη παγκόσμια κρίση της δημόσιας υγείας που τροφοδοτείται από την αύξηση του πληθυσμού, τη γήρανση του πληθυσμού, την ταχεία αστικοποίηση, τον ολοένα και πιο καθιστικό τρόπο ζωής, την αλλαγή του τρόπου ζωής, την αλλαγή των διατροφικών συνηθειών, είναι πιθανόν να οδηγήσει σε μια αύξηση της τάξεως του 54% της νόσου σε όλο τον κόσμο έως το 2030. Ανάμεσα στις χώρες με το μεγαλύτερο αριθμό ασθενών με τη συγκεκριμένη νόσο συγκαταλέγονται οι εξής: Ινδία, Κίνα, ΗΠΑ, Ινδονησία, Ιαπωνία, Πακιστάν, Ρωσία, Βραζιλία, Ιταλία και Μπαγκλαντές [Wild et al., 2004] (Εικόνα 1).



**Εικόνα 1:** Ο επιπολασμός του Σακχαρώδους Διαβήτη παγκοσμίως [WHO, Diabetes Action Now booklet].

Τα στατιστικά στοιχεία για το Σακχαρώδη Διαβήτη κατά τα έτη 2012 και 2013 δείχνουν ότι η νόσος και οι επιπλοκές της είχαν ως αποτέλεσμα τη θνησιμότητα 1,5-5,1 εκατομμυρίων ατόμων ετησίως, καθιστώντας την ως την 8<sup>η</sup> κύρια αιτία θανάτου παγκοσμίως [Tao Z. et al., 2015]. Πάνω από το 80% των θανάτων από διαβήτη συμβαίνουν σε χώρες χαμηλού και μεσαίου εισοδήματος [WHO, 2014].

Η Διεθνής Ομοσπονδία για το Διαβήτη (IDF) εκτιμά ότι ο επιπολασμός του ΣΔ σε παγκόσμια κλίμακα θα αυξηθεί σε 552 εκατομμύρια μέχρι το 2030, ενώ για το 2011 εκτιμά ότι 52 εκατομμύρια Ευρωπαίοι ηλικίας 20-79 ετών πάσχουν από Σακχαρώδη Διαβήτη και ότι ο αριθμός αυτός θα αυξηθεί σε πάνω από 64 εκατομμύρια έως το 2030 [IDF, 2011] (Εικόνα 2).



**Εικόνα 2:** Ο αριθμός των ατόμων με Σακχαρώδη Διαβήτη από τη Διεθνή Ομοσπονδία για το Διαβήτη [IDF, Diabetes Atlas Sixth Edition Update, 2014].

<b>Diabetes in Europe (20-79 years)</b>	<b>2014</b>	<b>2035</b>
Total population (millions)	910	928
Adult population (millions)	660.6	668.7
Number of people with diabetes (millions)	52	68.9
Regional prevalence (%)	7.9	10.3
Comparative prevalence (%)	6.2	7.1
Undiagnosed cases (millions)	17.2	-
Total diabetes-related deaths (thousands)	537	-
Deaths under the age of 60 (%)	23.1	-
Total diabetes-related health expenditure (USD billions)	144.3	158.6

**Πίνακας 1:** Επιδημιολογικά στοιχεία για το διαβήτη στην Ευρώπη [IDF, Diabetes Atlas Sixth Edition Update, 2014].

Στην Ελλάδα το ποσοστό του πληθυσμού που φαίνεται να πάσχει από Σακχαρώδη Διαβήτη είναι περίπου 10%. Το 80% των ασθενών με διαβήτη τύπου 2 είναι παχύσαρκοι και σύμφωνα με την επιδημιολογική μελέτη της Ελληνικής Εταιρίας Παχυσαρκίας, το 41% των ανδρών και το 30% των γυναικών είναι υπέρβαροι γεγονός που κατατάσσει τη χώρα μας στις πρώτες θέσεις στην ΕΕ κατανάλωσης φαρμάκων έναντι του Σακχαρώδη Διαβήτη. [Ινστιτούτο Φαρμακευτικής Έρευνας & Τεχνολογίας, <http://www.ifet.gr/diabetes2005/IFET.pdf>].



### 1.3 ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΤΟΥ ΣΑΚΧΑΡΩΔΟΥΣ ΔΙΑΒΗΤΗ:

Ο Σακχαρώδης Διαβήτης μπορεί να ταξινομηθεί σε τέσσερις κλινικές κατηγορίες:

- **ΣΔ τύπου I ή ινσουλινοεξαρτώμενος σακχαρώδης διαβήτης (IDDM) ή νεανικός διαβήτης**
- **ΣΔ τύπου II ή μη-ινσουλινοεξαρτώμενος σακχαρώδης διαβήτης (NIDDM) ή διαβήτης των ενηλίκων**
- **Σακχαρώδης διαβήτης κύησης (GDM)**
- **Άλλες ειδικές μορφές διαβήτη** που οφείλονται σε άλλες αιτίες, π.χ. γενετικές ανωμαλίες στη λειτουργία των β-κυττάρων, γενετικές διαταραχές στη δράση της ινσουλίνης, παθήσεις του εξωκρινούς παγκρέατος και αναφέρονται ως **ώριμη έναρξη του νεανικού διαβήτη (MODY)** και **όψιμος αυτοάνοσος διαβήτης των ενηλίκων (LADA)**

[American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes, Diabetes Care 2014].

Η συντριπτική πλειοψηφία των περιπτώσεων του διαβήτη εμπίπτουν στις δύο πρώτες κατηγορίες.

Ο διαβήτης τύπου 1 και τύπου 2 ταυτοποιήθηκαν ως ξεχωριστές συνθήκες για πρώτη φορά από τον Harold Percival Himsworth τον Ιανουάριο του 1936 [Himsworth, 1936].

#### Classification of Diabetes

- **Type 1 diabetes**
  - β-cell destruction
- **Type 2 diabetes**
  - Progressive insulin secretory defect
- **Other specific types of diabetes**
  - Genetic defects in β-cell function, insulin action
  - Diseases of the exocrine pancreas
  - Drug- or chemical-induced
- **Gestational diabetes mellitus (GDM)**

ADA. 2. Classification and Diagnosis. Diabetes Care 2015;38(suppl 1):S8

**Πίνακας 2:** Ταξινόμηση των μορφών του διαβήτη [American Diabetes Association, Classification and Diagnosis, Diabetes Care 2015].



### **1.3.1 Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου I (ινσουλινοεξαρτώμενος σακχαρώδης διαβήτης, Insulin-Dependent Diabetes Mellitus, IDDM) ή νεανικός διαβήτης:**

Ο Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου I (ΣΔΤ1) αναπτύσσεται κυρίως στην παιδική και την εφηβική ηλικία, χωρίς να αποκλείονται οι ενήλικες. Κατατάσσεται ως μια χρόνια αυτοάνοση νόσος, που πιστεύεται ότι προκαλείται σε γενετικά προδιατεθειμένα άτομα ξεκινώντας από μια ανοσολογική διεργασία που καταλήγει σε προοδευτική καταστροφή των β-κυττάρων των νησιδίων Langerhans του παγκρέατος, προκαλώντας ένδεια ινσουλίνης (ινσουλινοπενία). Αυτό έγκειται στην παρουσία ορισμένων αυτο-αντισωμάτων που στρέφονται εναντίον των β-κυττάρων και των πρωτεϊνών που συμμετέχουν στη σύνθεση της ινσουλίνης, με αποτέλεσμα μια φυσικά επακόλουθη εξάρτηση των νοσούντων επί εξωγενούς χορήγησης ινσουλίνης προς επιβίωση [Chiang J.L. et al., 2014] [S.Wild et al., 2004] [WHO, 2014] [Diabetes Care, 2014] [ADA, 2010]. Σε αυτά τα αυτο-αντισώματα ανήκουν: τα αντισώματα έναντι της ενδογενούς ινσουλίνης (IAA), τα αντισώματα έναντι της αποκαρβοξυλάσης του γλουταμινικού οξέος (GAD65), τα αντισώματα έναντι της φωσφατάσης της τυροσίνης (IA2A), και τα αντισώματα έναντι των κυττάρων των νησιδίων του Langerhans του παγκρέατος (ICA). Περισσότερο από το 95% των ατόμων με νεοδιαγνωσθέντα ΣΔΤ1 έχουν αυτο-αντισώματα σε τουλάχιστον ένα από αυτά τα αντιγόνα [Thrower S.L., Bingley P.J., 2011]. Σε ορισμένους όμως ασθενείς, ιδίως αφρικανικής και ασιατικής καταγωγής, δεν τεκμηριώνεται αυτοανοσία και λόγω μη ύπαρξης άλλων αιτιών ο διαβήτης χαρακτηρίζεται ως τύπου 1 ιδιοπαθής [The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, 1997].

Στο ΣΔΤ1, η καταστροφή των β παγκρεατικών κυττάρων είναι ταχεία σε ορισμένα άτομα, κυρίως βρέφη και παιδιά, ενώ στους ενήλικες είναι πιο αργή [Diabetes Care, 1997]. Στο τελευταίο στάδιο της νόσου, υπάρχει μικρή ή καθόλου έκκριση ινσουλίνης, η οποία εκδηλώνεται με χαμηλά ή μη ανιχνεύσιμα επίπεδα C-πεπτιδίου στο πλάσμα. Το υπολειπόμενο C-πεπτίδιο μπορεί να ανιχνευθεί πάνω από 40 χρόνια μετά, ανεξάρτητα από το αν η αρχική διάγνωση έγινε κατά τη παιδική ηλικία ή την ενήλικη ζωή [Davis et al., 2013]. Η κληρονομικότητα δε φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση του συγκεκριμένου τύπου διαβήτη.

Σύμφωνα με την Ελληνική Ομοσπονδία για το Διαβήτη, ο ΣΔΤ1 αποτελεί κλινικό σύνδρομο που χαρακτηρίζεται από υπεργλυκαιμία, αύξηση του σακχάρου στο αίμα λόγω μειωμένης έκκρισης ή/και δράσης της ινσουλίνης, καθώς και πολυουρία, πολυδιψία που είναι χαρακτηριστικό της υπερωσμωτικότητας λόγω

υπεργλυκαιμίας, πολυφαγία, μυϊκή αδυναμία και ανεξήγητη απώλεια βάρους. Η έναρξη της νόσου είναι αιφνίδια και συνήθως γίνεται αντιληπτή όταν παρουσιαστεί διαβητική κετοξέωση, μία ιδιαίτερα επικίνδυνη κατάσταση για την ζωή του ασθενούς η οποία προκύπτει έπειτα από παρατεταμένη υπεργλυκαιμία, επακόλουθο της υπερβολικής διάσπασης του λίπους από τον οργανισμό ώστε να καλύψει τις ενεργειακές του ανάγκες αφού δεν μπορεί να χρησιμοποιήσει τη γλυκόζη. Η θεραπεία του ΣΔΤ1 συνίσταται στη χορήγηση εξωγενούς ινσουλίνης (ανθρώπινη ινσουλίνη η οποία παράγεται με τη τεχνολογία ανασυνδιασμένου DNA) σε ενέσιμη μορφή ή στη χρήση αντλιών έγχυσης παρέχοντας ινσουλίνη σε συνεχή έκκριση μιμούμενη τη βασική έκκριση της ορμόνης από τα β κύτταρα του παγκρέατος.

### **1.3.2 Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου II (μη-ινσουλινοεξαρτώμενος σακχαρώδης διαβήτης, Non-Insulin-Dependent Diabetes Mellitus, **NIDDM**) ή διαβήτης των ενηλίκων:**

Ο Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου II (ΣΔΤ2) αντιπροσωπεύει το 90% των περιπτώσεων με διαβήτη σε παγκόσμιο επίπεδο [WHO, 1999]. Είναι η πιο συχνά απαντώμενη μορφή ΣΔ και θεωρείται ως ένα είδος πανδημίας στη σύγχρονη εποχή. Ο χαρακτηρισμός του ως διαβήτης των ενηλίκων, οφείλεται στο γεγονός ότι αναπτύσσεται συνήθως κατά την ενήλικη ζωή, ωστόσο, τα τελευταία χρόνια διαγιγνώσκεται ακόμη και σε άτομα νεαρής ηλικίας όπως παιδιά κι εφήβους. Σημαντικούς προδιαθεσικούς παράγοντες για την ανάπτυξη του ΣΔΤ2 αποτελούν η σπλαχνική παχυσαρκία, η μειωμένη σωματική δραστηριότητα, και η κατανάλωση τροφίμων με υψηλό γλυκαιμικό δείκτη (GI) και υψηλό γλυκαιμικό φορτίο (GL) [Zunino S., 2009]. Οι περισσότεροι ασθενείς με αυτή τη μορφή διαβήτη είναι παχύσαρκοι, και η ίδια η παχυσαρκία προκαλεί κάποιο βαθμό αντίστασης στην ινσουλίνη. Συχνά συνδέεται με μια ισχυρή γενετική προδιάθεση, περισσότερο από ότι η αυτοάνοση μορφή του ΣΔΤ1 [ADA, 2010] [The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, 1997]. Εμφανίζεται πιο συχνά σε γυναίκες με προηγούμενο Σακχαρώδη Διαβήτη κύησης και σε άτομα με υπέρταση ή δυσλιπιδαιμία και η συχνότητά του ποικίλλει σε διαφορετικές φυλετικές/εθνικές υποομάδες [Diabetes Care, 2010].

Λόγω του ταχέως αυξανόμενου επιπολασμού της συγκεκριμένης μεταβολικής διαταραχής υπολογίζεται ότι σε μερικές δεκαετίες, ο ΣΔΤ2, θα αποτελεί ένα από τα μεγαλύτερα προβλήματα της παγκόσμιας υγείας [Diamond J., 2003]. Όσον αφορά στη παθοφυσιολογία του ΣΔΤ2, παρατηρείται μείωση της διαθέσιμης ινσουλίνης στον οργανισμό «υποϊνσουλινισμός», αυξημένη ενδογενής

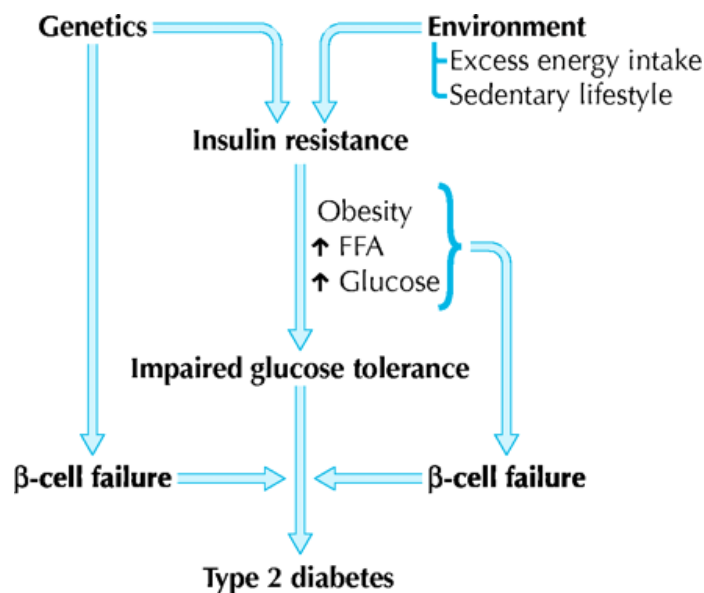
παραγωγή γλυκόζης από το ήπαρ, ελαττωματική λειτουργία/ανεπάρκεια των β-κυττάρων του παγκρέατος, ανάπτυξη περιφερικής αντίστασης στην ινσουλίνη, φλεγμονή του λιπώδους ιστού καθώς και απορρύθμιση της παραγωγής των αντιποκινών, ορμονών που φαίνεται να ρυθμίζουν την ευαισθησία στην ινσουλίνη [Nolan C.J. et al., Lancet 2011]. Η αιτία της προοδευτικής ανεπάρκειας των β-παγκρεατικών κυττάρων δεν είναι πλήρως κατανοητή, αλλά φαίνεται να προκύπτει από έναν αριθμό παραγόντων, συμπεριλαμβανομένων των γενετικών καθοριστικών παραγόντων, της χρόνιας φλεγμονής, της γλυκοτοξικότητας και των επιβλαβών αποτελεσμάτων από τα αυξημένα επίπεδα ελεύθερων λιπαρών οξέων στη λειτουργία των β-κυττάρων, «λιποτοξικότητα» [Kashyap S. et al., 2003]. Η αρχική αντίδραση του οργανισμού είναι η αύξηση της μάζας των παγκρεατικών β-κυττάρων και της ποσότητας ινσουλίνης που εκκρίνεται για να υπερνικηθεί η ινσουλινοαντοχή. Καθώς η νόσος εξελίσσεται, η παγκρεατική παραγωγή και η έκκριση ινσουλίνης μειώνονται, οδηγώντας σε προοδευτική υπεργλυκαιμία [Buchanan TA, 2003] [DeFronzo R.A., 1992].

Ο ΣΔΤ2 χαρακτηρίζεται από υπεργλυκαιμία που οφείλεται σε ελαττωματική έκκριση ινσουλίνης ή/και μειωμένη δραστηριότητα της ινσουλίνης σε διάφορους ιστούς όπως μυς, ήπαρ, και λιπώδη ιστό. Η αντίσταση στην ινσουλίνη, η οποία είναι συνήθως παρούσα πριν την έναρξη του κλινικού διαβήτη, καθορίζεται από έναν αριθμό παραγόντων, συμπεριλαμβανομένης της γενετικής, της ηλικίας, της παχυσαρκίας και, αργότερα της ίδιας της υπεργλυκαιμίας. Η αντίσταση στην ινσουλίνη μπορεί να βελτιωθεί με μείωση του βάρους ή/και φαρμακολογική θεραπεία της υπεργλυκαιμίας, αλλά σπάνια αποκαθίσταται στο φυσιολογικό [ADA, 2010]. Η ίδια η υπεργλυκαιμία επιδεινώνει την αντίσταση στην ινσουλίνη και μειώνει την έκκρισή της [Buchanan, 2003]. Δυσλιπιδαιμία και υπέρταση συχνά συνοδεύουν την αντίσταση στην ινσουλίνη [Fonseca V.A., 2003].

Τα συμπτώματα του ΣΔΤ2 μπορεί να είναι παρόμοια με εκείνα του ΣΔΤ1, αλλά εμφανίζονται συνήθως σταδιακά και βαθμιαία. Οι ασθενείς μπορεί να παρουσιάζουν καθόλου ή ελάχιστη συμπτωματολογία για χρόνια πριν να διαπιστωθεί η νόσος. Ως αποτέλεσμα, ο ΣΔΤ2 μπορεί να διαγιγνώσκεται αρκετά χρόνια μετά την έναρξη, αφού έχουν ήδη προκύψει επιπλοκές [WHO, 2013]. Στα ανωτέρω συγκαταλέγονται η πολυουρία, η πολυδιψία, η πολυφαγία και η ανεξήγητη απώλεια σωματικού βάρους, ξηροστομία, κόπωση όπως επίσης μούδιασμα, διαταραχή της αισθητικότητας του πόνου, της θερμότητας και της εν τω βάθει αισθητικότητας, όπως και διαταραχές της όρασης και επαναλαμβανόμενες λοιμώξεις [WHO, 2014]. Όπως και στον ΣΔΤ1, αυτοί οι ασθενείς βρίσκονται σε αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης μακροαγγειακών και μικροαγγειακών επιπλοκών [ADA, 2010].

Στις χρόνιες επιπλοκές της νόσου περιλαμβάνονται η διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια, η διαβητική νεφροπάθεια που οδηγεί σε νεφρική ανεπάρκεια, η νευροπάθεια ως αποτέλεσμα της μειωμένης ροής αίματος στα νεύρα, καρδιαγγειακές επιπλοκές όπως αθηροσκλήρωση και καρδιαγγειακή νόσο, αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο και ανεπάρκεια της ροής του αίματος στα πόδια. Το υπερωσμωτικό μη κετονικό κώμα ανήκει στις οξείες επιπλοκές του διαβήτη τύπου 2. Σύμφωνα με την Ελληνική Ομοσπονδία για το Διαβήτη, τα άτομα που διατρέχουν τον υψηλότερο κίνδυνο ανάπτυξης ΣΔΤ2 είναι αυτά που εμφανίζουν κλινικά στοιχεία του μεταβολικού συνδρόμου όπως υπέρταση, αύξηση της περιφέρειας μέσης και διαταραχές των λιπιδίων του αίματος.

Οι κατευθυντήριες οδηγίες για τον έλεγχο του ΣΔΤ2 αναφέρονται κυρίως σε κατάλληλη διατροφή, άσκηση και χορήγηση υπογλυκαιμικών φαρμάκων. Η φαρμακευτική αγωγή που συνηθίζεται σε αυτούς τους ασθενείς, η οποία έχει διαφορετικό τρόπο και στόχο δράσης είναι: σουλφονουριδίες, διγουανιδίνες για να αυξηθεί η παγκρεατική έκκριση ινσουλίνης, αναστολείς της  $\alpha$ -γλυκοσιδάσης που καθυστερούν την εντερική απορρόφηση των υδατανθράκων, θειαζολιδινεδιόνες ή ευαισθητοποιητές ινσουλίνης που στοχεύουν τα λιποκύτταρα και την αντοχή των μυών στην ινσουλίνη, ο εντερικός αναστολέας της λιπάσης η ορλιστάτη η οποία αναστέλλει την απορρόφηση λίπους και προωθεί την απώλεια βάρους σε παχύσαρκους ασθενείς, ή ακόμη και ινσουλίνη. [Οικονομακός Ν.Γ., 2001].



**Εικόνα 3:** Ανασκόπηση της παθογένεσης του ΣΔΤ2 [Cheng, Fantus, 2005].

### **1.3.3 Σακχαρώδης Διαβήτης Κύησης (Gestational Diabetes Mellitus, GDM):**

Ο Σακχαρώδης Διαβήτης Κύησης (ΣΔΚ) έχει αναγνωριστεί κλινικά εδώ και πολλά χρόνια. Περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1824 στη Γερμανία [Hadden, Hillebrand, 1989]. Περίπου 7% των κυήσεων περιπλέκονται από ΣΔΚ, με αποτέλεσμα περισσότερο από 200.000 περιπτώσεις ετησίως [ADA, 2010]. Δεν είναι σαφώς έκδηλη μορφή Σακχαρώδη Διαβήτη και ορίζεται ως μειωμένη ανοχή στη γλυκόζη με έναρξη ή πρώτη αναγνώριση κατά τη διάρκεια της κύησης [ADA, 2001]. Αποτελεί μεταβολική διαταραχή στη γλυκόζη που δύναται να παρουσιαστεί κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, συνήθως στο δεύτερο τρίμηνο (24η-28η εβδομάδα) [Hoet J.P. & Lukens F.D., 1954]. Σύμφωνα με την Ελληνική Ομοσπονδία για το Διαβήτη, οι παράγοντες που προδιαθέτουν στην εμφάνισή του είναι το αυξημένο σωματικό βάρος της εγκύου, το οικογενειακό ιστορικό διαβήτη τύπου 2 και η ανάπτυξη διαβήτη σε προηγούμενη εγκυμοσύνη. Ακόμη, ένα μεγαλύτερο, σε βάρος από το κανονικό, μωρό κατά τη διάρκεια της κύησης μπορεί να παρακινήσει για διαβητικό έλεγχο. Στη διάρκεια της εγκυμοσύνης, το έμβρυο τρέφεται δια μέσου του πλακούντα. Ο πλακούντας με τη σειρά του παράγει ορισμένες ορμόνες, απαραίτητες για τη φυσιολογική ανάπτυξη και θρέψη του εμβρύου, οι οποίες δυσχεραίνουν τον μεταβολισμό γλυκόζης στο σώμα της εγκύου, παρεμβαίνουν στη δράση της ινσουλίνης μειώνοντας την αποτελεσματικότητά της, οδηγώντας σε αυξημένα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα [Buchanan et al., 2007]. Ο ΣΔΚ χαρακτηρίζεται από υπεργλυκαιμία και οι γυναίκες που εκδηλώνουν την επιπλοκή διατρέχουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης διαβήτη τύπου 2 στο μέλλον [WHO, 1999, 2014]. Μια μετα-ανάλυση αναφέρει ότι επακόλουθη εξέλιξη του ΣΔ αυξάνεται σημαντικά μετά από ΣΔΚ [Bellamy et al., 2009].

### **1.3.4 Άλλες ειδικές μορφές Σακχαρώδη Διαβήτη:**

Στην πλειοψηφία τους, αυτές οι ειδικές μορφές του διαβήτη αναφέρονται ως ώριμη έναρξη του νεανικού διαβήτη, τύπου MODY. Η πρώτη αναφορά του όρου MODY έρχεται από τον Fajans SS το 1979. Οφείλονται σε γενετικές διαταραχές της λειτουργίας των β-κυττάρων και παρουσιάζουν φυσιολογικά επίπεδα ινσουλίνης αλλά δυσανάλογα χαμηλά σε σχέση με την υπεργλυκαιμία. Συχνά χαρακτηρίζονται από την έναρξη διαβήτη σε νεαρή ηλικία, καθώς και ανεπαρκή έκκριση ινσουλίνης λόγω ύπαρξης γενετικών ελλειμμάτων των β-κυττάρων, χωρίς να εμφανίζονται διαταραχές στη δράση της ινσουλίνης στα

όργανα στόχους. Κληρονομούνται με αυτοσωματικό κυρίαρχο μοτίβο [Fajans et al., 2001]. Μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί ανωμαλίες-μεταλλάξεις σε έξι γονίδια σε διαφορετικά χρωμοσώματα. Στο χρωμόσωμα 20 στο γονίδιο του HNF-4α (MODY1), στο χρωμόσωμα 7 στο γονίδιο της γλυκοκινάσης (MODY2), στο χρωμόσωμα 12 στο γονίδιο του HNF-1α (MODY3), στο χρωμόσωμα 13 στο γονίδιο του IPF-1 (MODY4), στο χρωμόσωμα 17 στο γονίδιο του HNF-1β (MODY5), και στο χρωμόσωμα 2 στο γονίδιο NeuroD1 (MODY6).

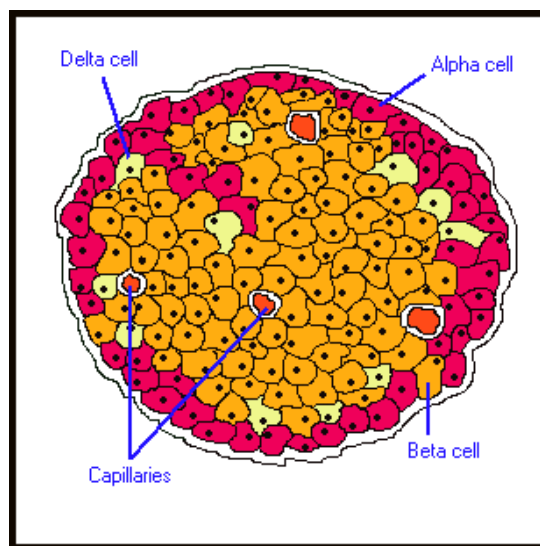
Ένας άλλος ειδικός τύπος διαβήτη είναι ο όψιμος αυτοάνοσος διαβήτης των ενηλίκων, LADA. Εμφανίζει κλινική εικόνα συμβατή με Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 2, παρά ταύτα παρουσιάζει αυτοαντισώματα όπως αυτά στο Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1. Δεν απαιτεί εξωγενή χορήγηση ινσουλίνης και χαρακτηρίζεται ως Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου 1 όψιμου ενάρξεως.

#### **1.4 ΟΜΟΙΟΣΤΑΣΗ ΤΗΣ ΓΛΥΚΟΖΗΣ ΚΑΙ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΙΝΣΟΥΛΙΝΗΣ:**

Για να διατηρηθεί το σωματικό βάρος σε σταθερά επίπεδα στο χρόνο, η εισαγωγή (intake) ενέργειας (κατανάλωση φαγητού) θα πρέπει να αντιστοιχεί στην κατανάλωση ενέργειας (το άθροισμα της εκκρινόμενης ενέργειας, των θερμικών απωλειών και της φυσικής δραστηριότητας), «ενεργειακό ισοζύγιο». Οποιαδήποτε απόκλιση από αυτή την ισορροπία οδηγεί σε αύξηση ή απώλεια βάρους. Οι άνθρωποι και τα περισσότερα θηλαστικά λαμβάνουν ενέργεια μέσα από διακριτά επεισόδια (discrete episodes) ή γεύματα. Η κύρια πηγή ενέργειας είναι η γλυκόζη. Οι περισσότεροι υδατάνθρακες περιέχουν γλυκόζη είτε ως δομική μονάδα, όπως στο άμυλο, είτε σε συνδυασμό με άλλους μονοσακχαρίτες, όπως στη λακτόζη. Μετά τη διάσπαση των υδατανθράκων στο λεπτό έντερο, η γλυκόζη απορροφάται από τα κύτταρα του εντέρου και οδηγείται στο αίμα. Μέσω του αίματος μεταφέρεται στα κύτταρα όπου και χρησιμοποιείται για την παραγωγή ενέργειας. Ωστόσο, η γλυκόζη δε μπορεί να εισέλθει στα κύτταρα χωρίς την παρουσία της ορμόνης ινσουλίνης. Αν δεν υπάρχει η ινσουλίνη, τα κύτταρα δε λαμβάνουν γλυκόζη και άρα ενέργεια, παρά το γεγονός ότι αυτή βρίσκεται σε μεγάλες ποσότητες στο αίμα. Η «κίνηση» της γλυκόζης στον οργανισμό και η ταυτόχρονη διατήρηση της συγκέντρωσής της στο αίμα σε δεδομένα επιθυμητά επίπεδα (ομοιόσταση της γλυκόζης) είναι μια περίπλοκη διαδικασία που ελέγχεται από το ρυθμιστικό σύστημα γλυκόζης –ινσουλίνης [Woods S.C. et al., 2006] [Ελένη Α. Δασκαλάκη, 2009].

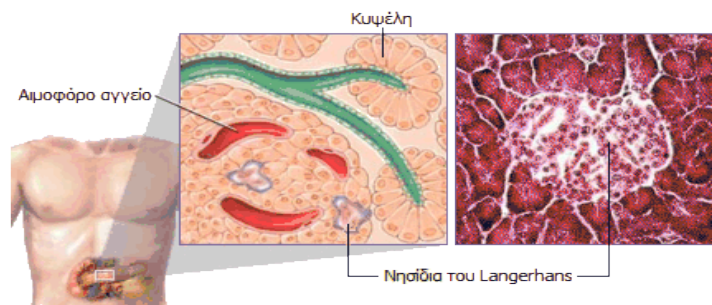
## 1.5 ΤΟ ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΓΛΥΚΟΖΗΣ – ΙΝΣΟΥΛΙΝΗΣ:

Η ενδοκρινής μοίρα του παγκρέατος αποτελείται από απομονωμένα νησίδια που ονομάζονται νησίδια του Langerhans (Εικόνα 4).

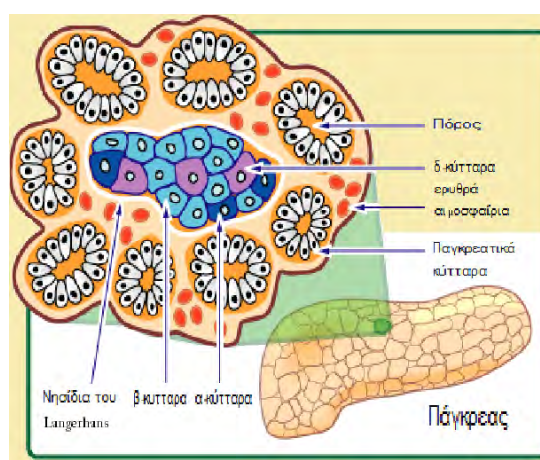


**Εικόνα 4:** Νησίδια του Langerhans.

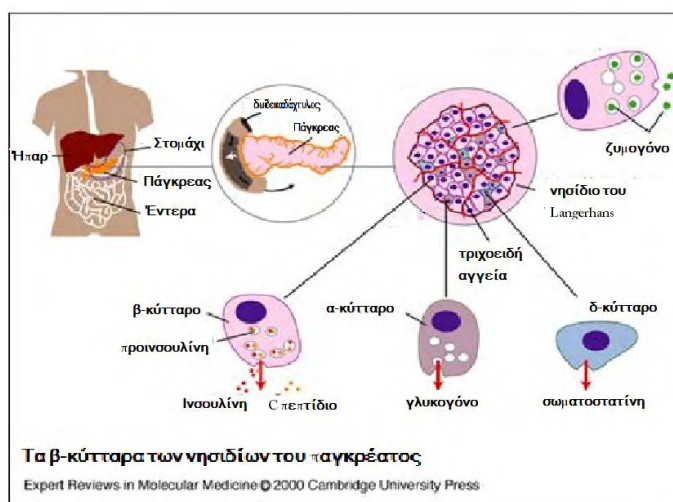
Στον ανθρώπινο οργανισμό τα νησίδια αυτά αριθμούν περίπου στο ένα εκατομμύριο, με συνολικό βάρος ιστού ένα γραμμάριο. Τα περισσότερα νησίδια περιέχουν τουλάχιστον τρεις τύπους κυττάρων: α-κύτταρα που εκκρίνουν γλυκογόνο, β-κύτταρα που εκκρίνουν ινσουλίνη και δ-κύτταρα που εκκρίνουν σωματοστατίνη (Εικόνες 5, 6 και 7). Τα β-κύτταρα αποτελούν το 80% του συνόλου των κυττάρων και βρίσκονται στο εσωτερικό των νησιδίων. Η περιφέρεια αποτελείται από α-κύτταρα, ενώ στο εσωτερικό βρίσκεται κι ένας μικρός αριθμός δ-κυττάρων. Οι ορμόνες που παράγονται από τα κύτταρα των νησιδίων του Langerhans έχουν πολυάριθμες λειτουργίες, η κυριότερη ωστόσο είναι κατά γενική ομολογία η ομοιοστάση της γλυκόζης [Woods S.C. et al., 2006] [Ελένη Α. Δασκαλάκη, 2009].



**Εικόνα 5:** Νησίδια του Langerhans στο ανθρώπινο πάγκρεας [Ελένη Α. Δασκαλάκη, Αθήνα 2009].



**Εικόνα 6:** Τύποι κυττάρων που περιέχονται στα νησίδια του Langerhans [Ελένη Α. Δασκαλάκη, Αθήνα 2009].



**Εικόνα 7:** Έκκριση ορμονών από το πάγκρεας, από κάθε είδος κυττάρων [Ελένη Α. Δασκαλάκη, Αθήνα 2009].



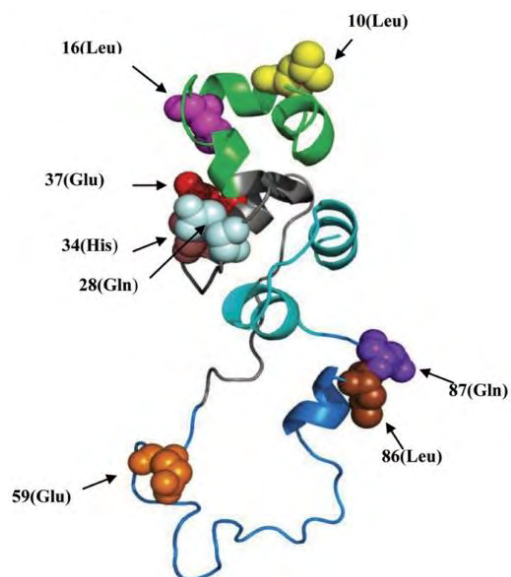
## 1.6 ΙΝΣΟΥΛΙΝΗ:



**Εικόνα 8:** Εξαμερές μόριο της ανθρώπινης ινσουλίνης, τρισδιάστατη απεικόνιση [RCSB, Protein Data Bank].

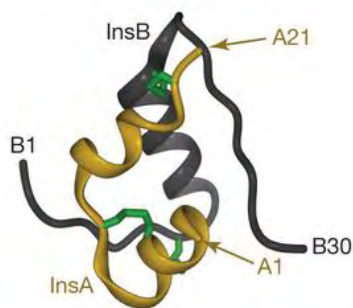
### 1.6.1 Χημική δομή, σύνθεση και απελευθέρωση της Ινσουλίνης:

Η ινσουλίνη είναι μία πρωτεΐνη, η οποία αποτελείται από δύο πολυπεπτιδικές αλυσίδες, Α και Β αντιστοίχως, οι οποίες συνδέονται μεταξύ τους με δισουλφιδικούς δεσμούς. Είναι στην πραγματικότητα ένα διπεπτίδιο, το οποίο περιέχει 51 αμινοξέα, με μοριακό βάρος 5802 daltons και ισοηλεκτρικό σημείο  $pH=5.5$ . Η αλυσίδα Α περιλαμβάνει 21 αμινοξέα και η Β αλυσίδα 30 αμινοξέα [Gisela Wilcox, 2005] [Steiner D.F. & Philipson L.H., 2009]. Στον ανθρώπινο οργανισμό, η ινσουλίνη συντίθεται στο πάγκρεας εντός των β-κύτταρων των νησιδίων του Langerhans. Ένα έως τρία εκατομμύρια νησίδια του Langerhans (παγκρεατικά νησίδια) σχηματίζουν το ενδοκρινικό μέρος του παγκρέατος, που είναι κυρίως ένας εξωκρινής αδένας. Το ενδοκρινικό τμήμα αντιπροσωπεύει μόνο το 2% της συνολικής μάζας του παγκρέατος. Εντός των νησιδίων του Langerhans, τα β-κύτταρα αποτελούν το 65-80% του συνόλου των κυττάρων. Η ινσουλίνη συντίθεται πρώτα στα β-κύτταρα του παγκρέατος ως ένα πρόδρομο πολυπεπτίδιο που ονομάζεται προ-προϊνσουλίνη [Ronald Kahn C. et al., 2005] [Steiner D.F. & Philipson L.H., 2009].

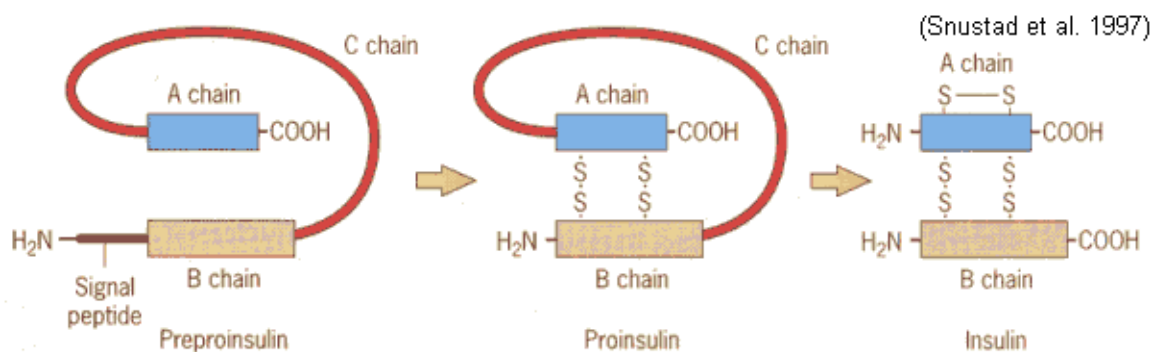


**Εικόνα 9:** Η δομή του ανθρώπινου μορίου της προ-προϊνσουλίνης [Wang S. et al., 2012].

Η προ-προϊνσουλίνη περιέχει μία αλληλουχία σήματος που αποτελείται από 24 αμινοξέα, η οποία κατευθύνει την εν τω γεννάσθαι πολυπεπτιδική αλυσίδα προς το αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο (RER). Η αλληλουχία σήματος διασπάται και μετατοπίζεται μέσα στον αυλό του RER, σχηματίζοντας την προϊνσουλίνη [Ronald Kahn C. et al., 2005]. Στο RER η προϊνσουλίνη διπλώνει στη σωστή διαμόρφωση και σχηματίζονται 3 δισουλφιδικοί δεσμοί. Η προϊνσουλίνη μεταφέρεται στο σύμπλεγμα Golgi, όπου σχηματίζονται ανώριμα κοκκία β παγκρεατικών κυττάρων, στα οποία και αποθηκεύεται. Έπειτα, υφίσταται ωρίμανση σε ενεργό ινσουλίνη μέσω της δράσης ορισμένων κυτταρικών ενδοπεπτιδασών γνωστές ως προορμόνη κονβερτάση (PC1 και PC2), καθώς και εξωπρωτεάση καρβοξυπεπτιδάσης E [Steiner D.F. & Oyer P.E., 1967]. Η πρωτεολυτική διάσπαση της προϊνσουλίνης από τις ενδοπεπτιδάσες οδηγεί σε απομάκρυνση του πεπτιδίου C, αφήνοντας 2 πεπτιδικές αλυσίδες, A και B, συνδεδεμένες με 2 δισουλφιδικούς δεσμούς, με αποτέλεσμα το σχηματισμό της ώριμης ινσουλίνης [Thomas E Creighton, 1993]. Η προκύπτουσα ώριμη ινσουλίνη περιέχεται εντός ώριμων κοκκίων σε αναμονή μεταβολικών σημάτων (όπως λευκίνης, αργινίνης, γλυκόζης, μαννόζης) και διέγερσης του πνευμονογαστρικού νεύρου, ώστε να γίνει εξωκυττάρωση κι έκκριση αυτών των ώριμων κοκκίων στην κυκλοφορία κι έτσι να απελευθερωθεί η ινσουλίνη στο αίμα [Najjar S., 2001].



**Εικόνα 10: Ινσουλίνη.** InsA, A αλυσίδα, InsB, B αλυσίδα [Nature 493: 241–245, 2013].



**Εικόνα 11: Μετατρέποντας την προ-προϊνσουλίνη σε ινσουλίνη.** Η απομάκρυνση της αλληλουχίας σήματος από την προ-προϊνσουλίνη και ο σχηματισμός δισουλφιδικών δεσμών οδηγούν στην παραγωγή προϊνσουλίνης. Με την περαιτέρω πρωτεολυτική διάσπαση και την απομάκρυνση του πεπτιδίου C, παράγεται ώριμη ινσουλίνη, η οποία αποτελείται από τις αλυσίδες A και B [Snustad et al., 1997].

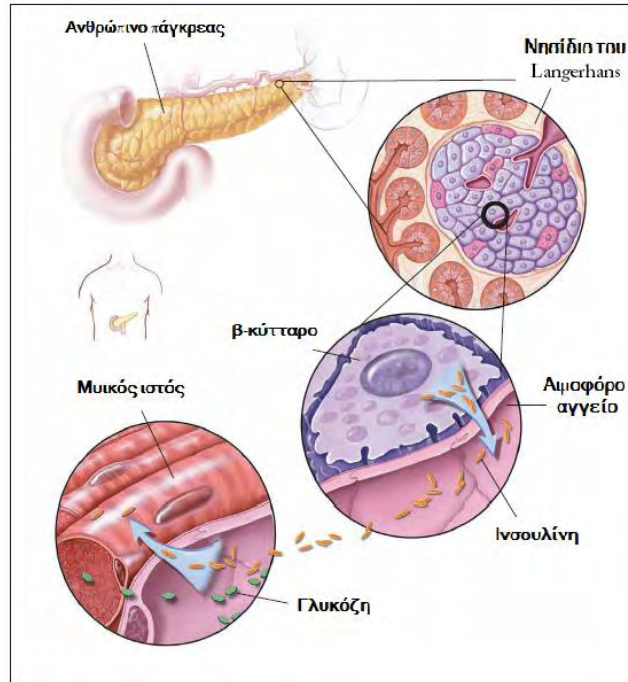
## 1.6.2 Φυσιολογικός ρόλος της Ινσουλίνης:

Η ινσουλίνη είναι μια ορμόνη με πολλαπλές δραστηριότητες. Η επίδρασή της αφορά κυρίως τον ηπατικό, τον μυϊκό και το λιπώδη ιστό.

Στο ήπαρ, η ινσουλίνη διαδραματίζει τέσσερις βασικούς ρόλους:

- i. Ενεργοποιεί την απορρόφηση της γλυκόζης μέσω της αποθήκευσής της, συνθέτοντας γλυκογόνο και εμποδίζοντας τη γλυκογονόλυση, δηλαδή τη διάσπαση του γλυκογόνου και την απελευθέρωση της γλυκόζης. Το γλυκογόνο είναι βασική μορφή εναποθήκευσης της γλυκόζης στο ήπαρ αλλά και στους μύες. Η απελευθέρωση της γλυκόζης στα διαστήματα νηστείας προέρχεται από τη διάσπαση του γλυκογόνου.
- ii. Ενεργοποιεί την απορρόφηση της γλυκόζης μέσω της διάσπασής της σε πυροσταφυλικό οξύ, δηλαδή την οξειδωσή της για παραγωγή ενέργειας (γλυκόλυση) και εμποδίζει τη γλυκονεογένεση δηλαδή τη μετατροπή του πυροσταφυλικού οξέος σε γλυκόζη.
- iii. Ενισχύει τη λιπογένεση, την εναποθήκευση δηλαδή λίπους και την παραγωγή τριγλυκεριδίων και εμποδίζει τη λιπόλυση, τη διάσπαση των λιπιδίων σε ελεύθερα λιπαρά οξέα.
- iv. Ενισχύει το μεταβολισμό των πρωτεϊνών ενώ ταυτόχρονα μειώνει τη διάσπαση των πρωτεϊνών.

Στους μύες η ινσουλίνη προωθεί την πρόσληψη γλυκόζης, ενεργοποιώντας ινσουλινοευαίσθητους μεταφορείς στην επιφάνειά τους, καθώς και την εναποθήκευσή της μέσω της μετατροπής της σε γλυκαγόνη και της οξειδωσής της. Επιπλέον, ενεργοποιεί, όπως και στο ήπαρ, τη σύνθεση πρωτεϊνών και την εναποθήκευση λίπους. Αντίστοιχη δράση παρουσιάζει και στα λιποκύτταρα. Στην εικόνα 12, παρακάτω, παρουσιάζεται ο ρόλος της ινσουλίνης και η επίδρασή της στους μύες και στους ιστούς του σώματος [Woods S.C. et al., 2006] [Ελένη Α. Δασκαλάκη, 2009].



**Εικόνα 12:** Η επίδραση της ινσουλίνης στους μύες και στους ιστούς του σώματος [Ελένη Α. Δασκαλάκη, Αθήνα 2009].

Τέλος, η ινσουλίνη εμποδίζει τη διαδικασία της κετογένεσης, της οξείδωσης δηλαδή των λιπαρών οξέων και της παραγωγής κετονικών σωμάτων. Εν συντομία, η ινσουλίνη ευνοεί αναβολικές διεργασίες οι οποίες λειτουργούν στην κατεύθυνση της πρόσληψης της γλυκόζης και της αποθήκευσης ενέργειας, πρωτεϊνών και λίπους [Woods S.C. et al., 2006] [Ελένη Α. Δασκαλάκη, 2009].

### 1.6.3 Δράση της Ινσουλίνης στο μεταβολισμό:

Η ινσουλίνη αντιπροσωπεύει μια από τις σημαντικότερες αναβολικές ορμόνες στον ανθρώπινο οργανισμό και η δράση της στους διάφορους ιστούς είναι ποικίλη και σύνθετη. Είναι μία πεπτιδική ορμόνη η οποία ρυθμίζει διάφορες μεταβολικές διαδικασίες και ως στόχο έχει να διατηρεί τα φυσιολογικά επίπεδα γλυκόζης στο αίμα, διευκολύνοντας την κυτταρική πρόσληψη γλυκόζης, ρυθμίζοντας το μεταβολισμό των υδατανθράκων, των λιπιδίων και των πρωτεϊνών [Whiteman et al., 2002]. Ρυθμίζει την ισορροπία των μακροθρεπτικών συστατικών, την ενεργειακή ομοιόσταση, κατευθύνοντας την διεργασία της λήψης

τροφής και είναι απαραίτητη για την ενδοκυτταρική μεταφορά της γλυκόζης σε ινσουλινοεξαρτώμενους ιστούς όπως οι μύες και ο λιπώδης ιστός. Όπως υπέθεσε ο Sir Edward Schafer [The Endocrine Organs, 1916], η ινσουλίνη έχει δύο κατηγορίες δράσης: (i) διεγερτική, διέγερση πρόσληψης γλυκόζης και σύνθεση των λιπιδίων, και (ii) ανασταλτική, αναστολή της λιπόλυσης, της πρωτεόλυσης, της γλυκογονόλυσης, της γλυκονεογένεσης και της κετογένεσης [Dube S. et al., 2013].

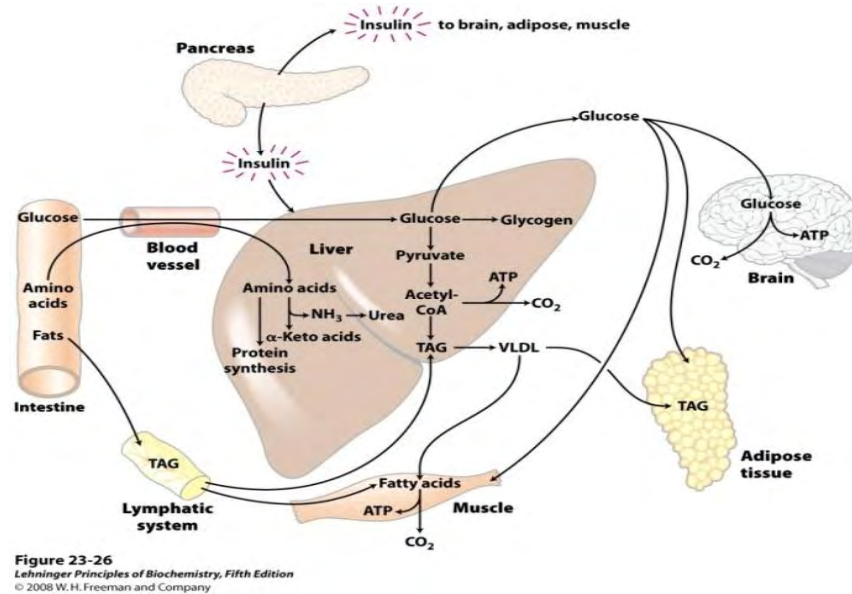
Η ινσουλίνη του πλάσματος είναι χαμηλή κατά τη διάρκεια της νηστείας και αυξάνεται κυρίως κατά τη μεταγευματική κατάσταση. Στην ουσία σηματοδοτεί την κατάσταση επάρκειας [Woods S.C. et al., 2006]. Μετά από την κατανάλωση ενός γεύματος η γλυκόζη, τα λιπαρά οξέα και τα αμινοξέα εισέρχονται στο ήπαρ. Η ινσουλίνη απελευθερώνεται από το πάγκρεας σε αναμονή και ως απόκριση της υψηλής συγκέντρωσης της γλυκόζης που κυκλοφορεί στο αίμα και σε μικρότερο βαθμό από άλλες ουσίες (πρωτεΐνες και λίπη). Ο πρωταρχικός ρόλος της ινσουλίνης από αυτή την άποψη, είναι η αποθήκευση των μεταβολικών υποστρωμάτων. Η ινσουλίνη διεγείρει τη σύνθεση γλυκογόνου τόσο στο ήπαρ όσο και στους μυς. Ωστόσο, η απελευθέρωσή της στην κυκλοφορία του αίματος έχει ως αποτέλεσμα κατά κύριο λόγο, την αύξηση της μεταφοράς γλυκόζης σε γλυκοεξαρτώμενους ιστούς όπως ο εγκέφαλος, στο μεταβολισμό, στο μυϊκό ιστό, στο λιπώδη ιστό και στον ηπατικό ιστό. Σε απάντηση στην ινσουλίνη, οι GLUT4 υποδοχείς που βρίσκονται σε κύτταρα ευαίσθητα σε αυτή, όπως τα μυϊκά και αυτά του λιπώδους ιστού, κινούνται στη μεμβράνη των κυττάρων για να διευκολύνουν την πρόσληψη της γλυκόζης έτσι ώστε να παρατηρείται ελάττωση παραγωγής γλυκόζης από το ήπαρ και να βοηθούν στη διατήρηση της ομοιόστασης της γλυκόζης στο αίμα [Khan A.H. & Pessin J.E., 2002].

Μία από τις κύριες δράσεις της ινσουλίνης στο μεταβολισμό των υδατανθράκων είναι η αύξηση της μεταφοράς της γλυκόζης διά μέσου της κυτταρικής μεμβράνης στον μυϊκό και το λιπώδη ιστό, καθώς και η αύξηση της γλυκόλυσης. Η διαδικασία αυτή περιλαμβάνει τη σύνδεση της γλυκόζης στην εξωτερική επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης με τους GLUT μεταφορείς, και την απελευθέρωσή της μόλις περάσει μέσα στα κύτταρα. Μια ακόμη δράση της ινσουλίνης είναι η αύξηση της σύνθεσης του γλυκογόνου στον μυϊκό και τον ηπατικό ιστό. Η έκκριση ινσουλίνης αναστέλλει την έκκριση γλυκαγόνης, η οποία διεγείρει την αποικοδόμηση του γλυκογόνου στο ήπαρ, ενώ ενεργοποιεί τη συνθάση του γλυκογόνου διεγείροντας τη σύνθεση γλυκογόνου στο ήπαρ, και απενεργοποιεί τη φωσφορυλάση του γλυκογόνου, ώστε η 6-φωσφορική γλυκόζη να μετατραπεί σε γλυκογόνο. Με λίγα λόγια, η ινσουλίνη αναστέλλει την παραγωγή γλυκόζης από το ήπαρ μειώνοντας το ρυθμό της γλυκογονόλυσης και της γλυκονεογένεσης [Dube S. et al., 2013].

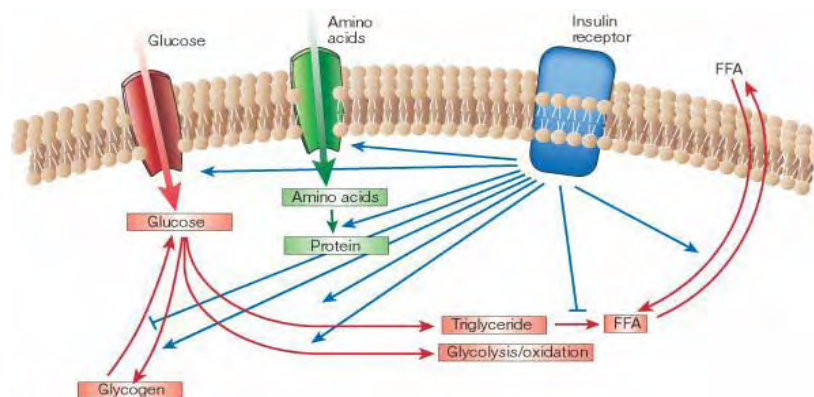
Όσον αφορά στο μεταβολισμό των λιπιδίων, τα τελευταία χρόνια έχει γίνει σαφές ότι ο λιπώδης ιστός είναι ένας μεταβολικά ενεργός ιστός που εκκρίνει πληθώρα ορμονών οι οποίες επηρεάζουν το ενεργειακό ισοζύγιο του οργανισμού, αλλά και την ευαισθησία των ιστών στην ινσουλίνη [Ahima R. & Flier J., 2000] [Coppack S. et al., 2001] [Frayn K., 2002] [Jensen M., 2002]. Ο ρόλος του λιπώδους ιστού είναι καθοριστικός για τη ρύθμιση των επιπέδων αλλά και της διακίνησης των ελεύθερων λιπαρών οξέων στη κυκλοφορία, κατά τη μεταγευματική περίοδο, και η σημασία του θεωρείται ανάλογη εκείνης του ήπατος και του μυϊκού ιστού για τον καθορισμό των επιπέδων και τη διακίνηση της γλυκόζης [Frayn K., 1994] [Frayn K., 2002] [Dimitriadis G. et al., 2006]. Η δράση της ινσουλίνης στο μεταβολισμό των λιπιδίων αρχικά ασκείται με ένα μηχανισμό που προωθεί τη λιπογένεση ενώ καταστέλλει τη λιπόλυση στον λιπώδη ιστό, με αποτέλεσμα τη μείωση των επιπέδων των ελεύθερων λιπαρών οξέων στο αίμα ώστε να μην μετατρέπονται σε κετόνες. Η ινσουλίνη ενεργοποιεί την οξειδωση της 6-φωσφορικής-γλυκόζης σε πυροσταφυλικό οξύ, σε περίσσεια γλυκόζης, δια μέσου της γλυκόλυσης στους μύες και στον εγκέφαλο, αλλά και την οξειδωση του πυροσταφυλικού οξέος σε ακέτυλο συνένζυμο Α. Το ακέτυλο-CoA χρησιμοποιείται για τη σύνθεση των λιπαρών οξέων, τριακυλογλυκερολών (TGs), τα οποία απομακρύνονται από το ήπαρ με κατεύθυνση το μυϊκό και το λιπώδη ιστό, με τη μορφή των λιποπρωτεϊνών πολύ χαμηλής πυκνότητας (VLDLs). Η περίσσεια των αμινοξέων μετατρέπεται σε πυροσταφυλικό οξύ και ακέτυλο-CoA, τα οποία χρησιμοποιούνται στη λιπιδική σύνθεση. Τα διαιτητικά λίπη με τη μορφή χυλομικρών, προχωρούν μέσω του λεμφικού συστήματος από το έντερο στο μυϊκό και στο λιπώδη ιστό (Εικόνα 13) [Lehninger, 2008]. Επιπλέον, η δράση της ινσουλίνης στο λιπώδη ιστό ασκείται και μέσω του ενζύμου λιποπρωτεϊνική λιπάση (LPL), η οποία διασπά τα τριγλυκερίδια (TGs) του αίματος σε ελεύθερα λιπαρά οξέα και γλυκερόλη. Μέσα στα λιποκύτταρα τα ελεύθερα λιπαρά οξέα επανεστεροποιούνται σε τριγλυκερίδια. Ο μηχανισμός αυτός είναι υπεύθυνος για την απομάκρυνση των TGs από την κυκλοφορία μετά τα γεύματα και την ενσωμάτωσή τους στις αποθήκες του λιπώδους ιστού [Dimitriadis G. et al., 2004].

Στο μεταβολισμό των πρωτεϊνών, η ινσουλίνη προκαλεί αύξηση της μεταφοράς αμινοξέων και της σύνθεσης πρωτεϊνών στο μυϊκό, λιπώδη και ηπατικό ιστό, καθώς και αναστολή της ενδοκυτταρικής αποδόμησης των πρωτεϊνών κυρίως στο μυϊκό ιστό [Stryer L. et al., 2012]. Η μεταφορά των αμινοξέων διά μέσου της κυτταρικής μεμβράνης απαιτεί την κατανάλωση ενέργειας από τη πλευρά του κυττάρου. Η ινσουλίνη αυξάνει τόσο τη μεταφορά όσο και την ενσωμάτωση των αμινοξέων στις κυτταρικές πρωτεΐνες, αναστέλλοντας ταυτόχρονα τη διάσπαση των πρωτεϊνών, μειωμένη πρωτεόλυση. Οι δράσεις αυτές έχουν ως αποτέλεσμα την αύξηση της σύνθεσης

πρωτεϊνών, μία από τις βασικότερες παραμέτρους που καθορίζουν τον αναβολικό χαρακτήρα της ινσουλίνης [Liu Z. & Barrett E., 2002].



**Εικόνα 13:** Η ρύθμιση της ινσουλίνης στο μεταβολισμό, σε κατάσταση σίτισης [Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition, 2008].



**Εικόνα 14:** Έλεγχος του κυτταρικού μεταβολισμού μέσω σηματοδότησης του υποδοχέα της ινσουλίνης [Nature Insight: Nature 414:781, Diabetes, 2001].



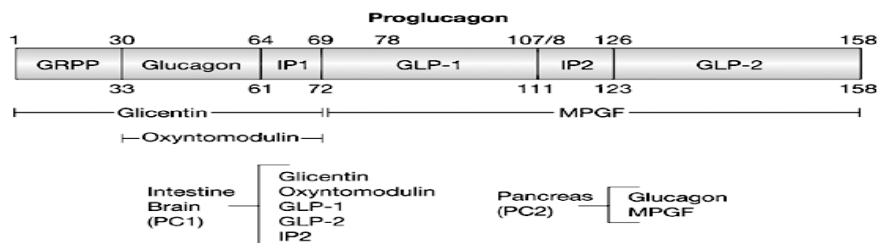
## 1.7 ΓΛΥΚΑΓΟΝΗ:



**Εικόνα 15:** Μόριο γλυκαγόνης, τρισδιάστατη απεικόνιση [RCSB, Protein Data Bank].

### 1.7.1 Χημική δομή, σύνθεση και απελευθέρωση της Γλυκαγόνης:

Η γλυκαγόνη είναι μία πρωτεΐνη η οποία αποτελείται από 29 αμινοξέα και έχει μοριακό βάρος 3485 daltons [Guyton & Hall, 11<sup>η</sup> έκδοση]. Είναι μια πεπτιδική, μη στεροειδής, ορμόνη που συντίθεται κι εκκρίνεται από τα α-κύτταρα των νησιδίων του Langerhans τα οποία βρίσκονται στο ενδοκρινικό τμήμα του παγκρέατος. Εντός των νησιδίων του Langerhans, τα α-κύτταρα αποτελούν περίπου το 15% έως 20% της συνολικής μάζας των κυττάρων [Cabrera O. et al., 2006]. Παρουσιάζει αντίστροφη δράση από την ινσουλίνη στους περιφερικούς ιστούς, κυρίως στο ήπαρ, διαδραματίζοντας σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό της γλυκόζης. Η γλυκαγόνη συντίθεται αρχικά ως προορμόνη 160 αμινοξέων (προγλυκαγόνη) [Patzelt C. & Schiltz E., 1984]. Παράγεται από τη διάσπαση της προγλυκαγόνης από την προορμόνη κονβερτάση 2 (PC2) στα α-κύτταρα των νησιδίων του παγκρέατος [Orskov C. et al., 1987].



**Εικόνα 16:** Δομή της προγλυκαγόνης και των πεπτιδίων που προέρχονται από προγλυκαγόνη, όπως είναι η γλυκαγόνη [Nature Clinical Practice Endocrinology & Metabolism, 2005].

### 1.7.2 Δράση της Γλυκαγόνης στο μεταβολισμό:

Φυσιολογικά, η γλυκαγόνη υποδηλώνει κατάσταση ασιτίας. Έπειτα από μερικές ώρες νηστείας, το ήπαρ γίνεται το κύριο όργανο στόχος της γλυκαγόνης και ταυτόχρονα, η βασική πηγή γλυκόζης για τον εγκέφαλο [Stryer L. et al., 2012]. Όσον αφορά το μεταβολισμό της γλυκόζης, ο φυσιολογικός της ρόλος είναι η παραγωγή γλυκόζης από το ήπαρ που οδηγεί σε αύξηση της συγκέντρωσής της στο αίμα, μέσω της γλυκογονόλυσης και γλυκονεογένεσης, σε απόκριση στην επαγόμενη από ινσουλίνη υπογλυκαιμία [Reece J. & Campbell N. 2002] [Woods S.C. et al., 2006] [Ελένη Α. Δασκαλάκη, Αθήνα 2009]. Το πάγκρεας απελευθερώνει γλυκαγόνη, όταν η συγκέντρωση της γλυκόζης στο αίμα σπανίζει, η οποία κινητοποιεί τα αποθέματα γλυκογόνου όταν δεν υπάρχει πρόσληψη γλυκόζης από τις τροφές. Η γλυκαγόνη προσδένεται στους υποδοχείς της γλυκαγόνης στα ηπατοκύτταρα και διεγείρει τη διάσπαση του γλυκογόνου του ενεργοποιώντας τη φωσφορυλάση και απενεργοποιώντας τη συνθάση του γλυκογόνου. Έτσι, το γλυκογόνο του ήπατος διασπάται και η 1-φωσφορική γλυκόζη που παράγεται μετατρέπεται σε 6-φωσφορική γλυκόζη κι έπειτα σε ελεύθερη γλυκόζη, η οποία απελευθερώνεται στην κυκλοφορία του αίματος. Υψηλά επίπεδα γλυκόζης στο αίμα διεγείρουν την απελευθέρωση της ινσουλίνης, η οποία επιτρέπει στη γλυκόζη να λαμβάνεται και να χρησιμοποιείται από γλυκοζοεξαρτώμενους ιστούς. Χαμηλά επίπεδα γλυκόζης στο αίμα προκαλούν την έκκριση της γλυκαγόνης και τη μείωση της ινσουλίνης. Έτσι, η γλυκαγόνη και η ινσουλίνη αποτελούν μέρος ενός συστήματος ανατροφοδότησης που διατηρεί τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα σε ισορροπία για τον οργανισμό [Stryer L. et al., 2012].

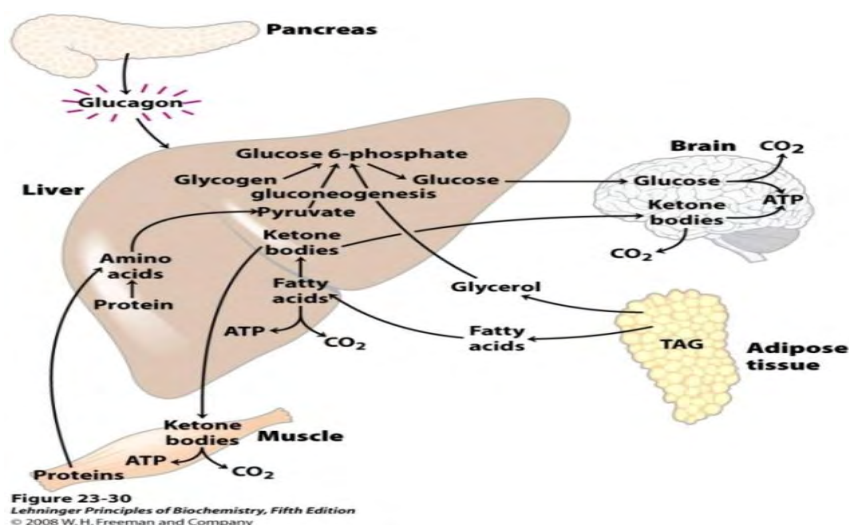
Επιπλέον, η γλυκαγόνη επάγει τη λιπόλυση στον ανθρώπινο οργανισμό κάτω από συνθήκες καταστολής ινσουλίνης, όπως ο ΣΔΤ1 [Liljenquist J.E. et al., 1974]. Νεότερα δεδομένα αναφέρουν πως η γλυκαγόνη στο ήπαρ ενεργοποιεί τη μερική οξείδωση των λιπαρών οξέων για την παραγωγή ενέργειας, καθώς προκαλεί την απελευθέρωση γλυκερόλης από τη διάσπαση των τριακυλογλυκερολών από το λιπώδη ιστό ώστε να εισέλθει στη γλυκονεογενετική πορεία (Εικόνα 17) [Carlson M.G. et al., 1993] [Stryer L. et al., 2012]. Η γλυκαγόνη σε κατάσταση ασιτίας διεγείρει τη λιπάση των κυττάρων του λιπώδους ιστού, αυξάνοντας τα επίπεδα των ελεύθερων λιπαρών οξέων [Stryer L. et al., 2012]. Το ήπαρ χρησιμοποιεί τα λιπαρά οξέα σαν πρωταρχικό καύσιμο και η περίσσεια του ακέτυλο-CoA μετατρέπεται σε κετονικά σώματα για εξαγωγή ως καύσιμο σε άλλους ιστούς, όπως ο εγκέφαλος (Εικόνα 17) [Lehninger, 2008]. Ωστόσο, αρνητικά ευρήματα αναφέρθηκαν στο τεύχος του JCEM το 2001, όπου δεν παρατηρήθηκαν επιδράσεις στη γλυκερόλη ή στα ελεύθερα λιπαρά οξέα μετά από συστηματική έγχυση γλυκαγόνης. Η μελέτη έδειξε ότι φυσιολογικά επίπεδα

γλυκαγόνης δεν επηρεάζουν τη λιπόλυση στο λιπώδη ιστό της κοιλιακής χώρας και τα διαθέσιμα στοιχεία δεν υποστηρίζουν κάποιο σημαντικό φυσιολογικό ρόλο της γλυκαγόνης στη λιπόλυση [The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2001]. Μία ακόμη εκδοχή, είναι ότι η γλυκαγόνη αναστέλλει τη σύνθεση των λιπαρών οξέων μειώνοντας τη παραγωγή του πυροσταφυλικού και τη δραστηριότητα της καρβοξυλάσης του ακετυλο-CoA [Stryer L. et al., 2012].

Σε απάντηση ενός πρωτεϊνούχου γεύματος, στον οργανισμό υπάρχουν μεγάλα αποθέματα αμινοξέων, τα οποία προάγουν την αύξηση έκκρισης της γλυκαγόνης [Langhans et al., 1984] [Guyton & Hall, 11<sup>η</sup> έκδοση]. Τα αμινοξέα, τα οποία απελευθερώνονται από τη διάσπαση των πρωτεϊνών στο ήπαρ και στους μυς χρησιμοποιούνται για τη γλυκονεογένεση.

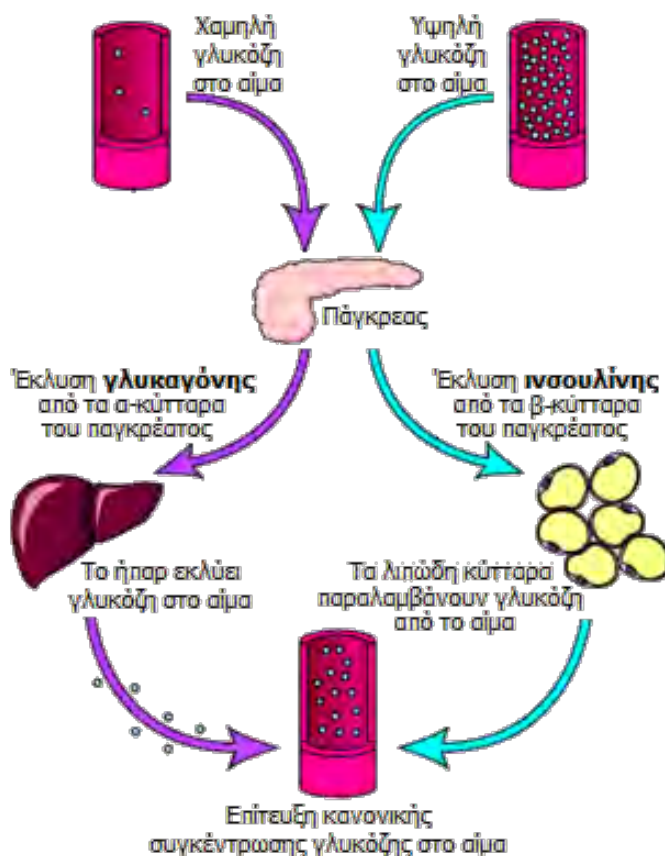
Η γλυκαγόνη είναι σημαντική για τη διατήρηση της ευγλυκαιμίας στη μετα-απορροφητική κατάσταση. Σε απάντηση ενός γεύματος υψηλής περιεκτικότητας σε υδατάνθρακες, τα επίπεδα της γλυκαγόνης στο αίμα μειώνονται, για πρόληψη της αύξησης της μεταγευματικής γλυκόζης [Lewis S.B. et al., 1977]. Η καταστολή της έκκρισης της γλυκαγόνης είναι σημαντική στη μείωση της ενδογενούς παραγωγής γλυκόζης και στο σχηματισμό του γλυκογόνου από την κατάποση υδατανθράκων.

Συμπερασματικά, η γλυκαγόνη ευνοεί καταβολικές κυρίως αντιδράσεις και έχει πρωταρχικό ρόλο στην ομοιόσταση της γλυκόζης, ενώ η παραγωγή και η έκκρισή της επηρεάζονται από τα επίπεδα κυρίως της γλυκόζης του πλάσματος και της ινσουλίνης.



**Εικόνα 17:** Η ρύθμιση της γλυκαγόνης στο μεταβολισμό, σε κατάσταση νηστείας [Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition, 2008].

## 1.8 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΙΝΣΟΥΛΙΝΗΣ ΚΑΙ ΓΛΥΚΑΓΟΝΗΣ ΣΤΟΝ ΕΛΕΓΧΟ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΤΗΣ ΓΛΥΚΟΖΗΣ ΤΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ:

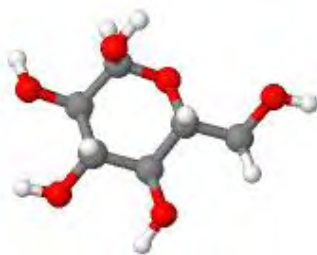


**Εικόνα 18:** Φυσιολογική ρύθμιση της συγκέντρωσης της γλυκόζης στο αίμα [Guyton & Hall, 11<sup>η</sup> έκδοση].

Η αύξηση της συγκέντρωσης της γλυκόζης στο αίμα οδηγεί στην απελευθέρωση ινσουλίνης από το πάγκρεας. Η ινσουλίνη κατευθύνεται στο ήπαρ, προκαλεί τη σύνθεση γλυκογόνου με επακόλουθη μείωση της συγκέντρωσης της γλυκόζης στο αίμα, η οποία οδηγεί σε απελευθέρωση γλυκαγόννης από το πάγκρεας και πρόσληψη αυτής από το ήπαρ. Στον ηπατικό ιστό, η γλυκαγόνη προκαλεί την αποικοδόμηση του γλυκογόνου και την παραγωγή γλυκόζης. Και οι δύο ορμόνες, στόχο έχουν να επαναφέρουν τα επίπεδα της γλυκόζης σε φυσιολογικά επίπεδα για τον οργανισμό. [The important roles of insulin and glucagon: Diabetes and Hypoglycemia].

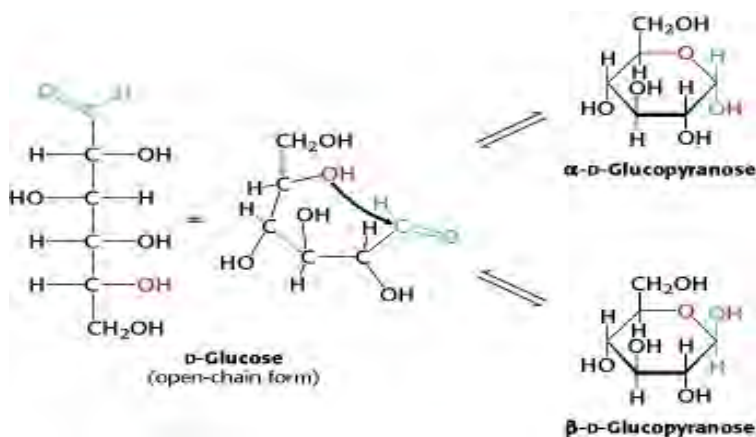
**2° ΜΕΡΟΣ**  
**ΒΑΣΙΚΕΣ ΓΝΩΣΕΙΣ**

## 2.1 ΓΛΥΚΟΖΗ:



**Εικόνα 19:** Μόριο γλυκόζης,  $C_6H_{12}O_6$ . [PDB ID: GLC].

Η γλυκόζη είναι ένας μονοσακχαρίτης, σημαντικό καύσιμο μόριο, ο οποίος αποτελείται από μια αλυσίδα 6 ατόμων άνθρακα (εξόζη) συνδεδεμένων με 12 άτομα υδρογόνου και 6 άτομα οξυγόνου. Η διαμόρφωση με την οποία συναντάται συνηθέστερα στη φύση είναι αυτή της D-γλυκόζης. Η D-γλυκόζη όταν βρίσκεται σε διάλυμα κυκλοποιείται σε δακτυλίους. Η αλδεϋδική ομάδα C-1 του τύπου ανοιχτής αλυσίδας της γλυκόζης αντιδρά με το υδροξύλιο του C-5 για να σχηματίσει μία ενδομοριακή ημιακετάλη. Ο εξαμελής δακτύλιος του σακχάρου που παράγεται καλείται πυρανόζη λόγω της ομοιότητάς του με το πυράνιο. Στη γλυκόζη, ο καρβονυλικός άνθρακας (C-1), στη μορφή ανοιχτής αλυσίδας, μετατρέπεται σε ένα ασύμμετρο κέντρο. Έτσι προκύπτουν δύο στερεοϊσομερή αλδόζης, η α-D-γλυκοπυρανόζη και η β-D-γλυκοπυρανόζη (Εικόνα 20). Η γλυκόζη στον ανθρώπινο οργανισμό αποθηκεύεται στο κυρίως στο ήπαρ και τους μύες ως γλυκογόνο, ενώ διανέμεται και χρησιμοποιείται στους ιστούς ως ελεύθερη γλυκόζη [Stryer L. et al., 2012].



**Εικόνα 20:** α-D-γλυκοπυρανόζη και β-D-γλυκοπυρανόζη [Berg J., Tymoczko J. and Stryer L. (2012), Biochemistry, 7<sup>th</sup> edition, New York].

Η γλυκόζη είναι η κύρια πηγή ενέργειας για τους περισσότερους ζωντανούς οργανισμούς. Υπάρχει στα τρόφιμα σαν φυσικό σάκχαρο, ενώ μπορεί να παραχθεί και στον οργανισμό ως αποτέλεσμα της πέψης πιο πολύπλοκων υδατανθράκων [McArdle et al., 2000]. Αποτελεί βασική πηγή ενέργειας του ανθρώπινου σώματος, προσφέροντας περίπου 3.75 Kcals (16 Kjoules) της ενέργειας των τροφίμων ανά γραμμάριο [FAO, 2003]. Μέσω της γλυκόλυσης και αργότερα στις αντιδράσεις του κύκλου του κιτρικού οξέος, η γλυκόζη οξειδώνεται αποδίδοντας ενέργεια κυρίως με τη μορφή ATP. Μπορεί ακόμη να συντεθεί από μη υδατανθρακικές πρόδρομες ενώσεις (γαλακτικό και αλανίνη από τους μυς, γλυκερόλη από το λιπώδη ιστό, γλυκογενετικά αμινοξέα από τις τροφές) μέσω της μεταβολικής πορείας της γλυκονεογένεσης σε καταστάσεις ασιτίας [Stryer L. et al., 2012].

Η γλυκόζη, για τους μύες αποτελεί σημαντικό καύσιμο μόριο, η οποία αποθηκεύεται σε αυτούς με τη μορφή γλυκογόνου, το οποίο μετατρέπεται σε 6-φωσφορική γλυκόζη (G6P) για χρήση μέσα στα μυϊκά κύτταρα. Για τον εγκέφαλο, αποτελεί πρωταρχικό ενεργειακό υπόστρωμα, εκτός από τα διαστήματα παρατεταμένης ασιτίας. Μεταφέρεται στα κύτταρα του εγκεφάλου μέσω του μεταφορέα γλυκόζης GLUT3. Το όργανο αυτό καταναλώνει περίπου 120g γλυκόζης ημερησίως η οποία υπολογίζεται ότι αντιστοιχεί στο 60% περίπου της ηπατικής παραγωγής σε γλυκόζη και χρησιμοποιείται για τις ανάγκες του κεντρικού νευρικού συστήματος. Έτσι, ο εγκέφαλος χρησιμοποιεί τη γλυκόζη ως βασικό καύσιμο υλικό [Stryer L. et al., 2012].

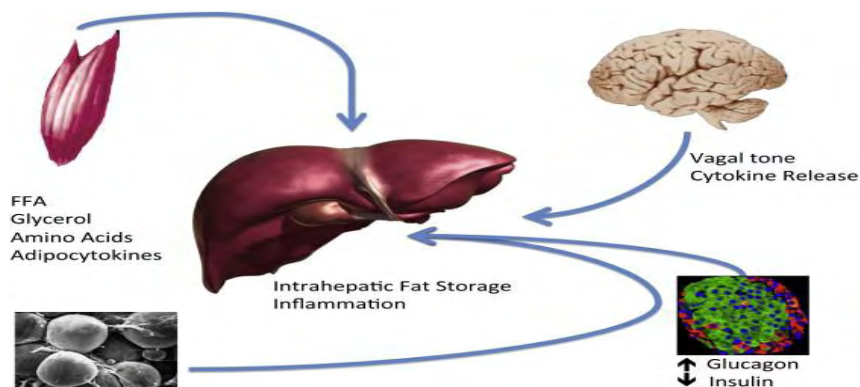
Επειδή η γλυκόζη διαδραματίζει τόσο σημαντικό ρόλο, η πυκνότητά της στο αίμα διατηρείται σε φυσιολογικά επίπεδα ακόμη και κατά τη διάρκεια έντονης μυϊκής δραστηριότητας [McArdle et al., 2000]. Η συγκέντρωσή της στο αίμα φυσιολογικά κυμαίνεται από περίπου 80 έως 120 mg ανά 100 ml (4,4-6,7 mM). Το ήπαρ ανιχνεύει τη συγκέντρωσή της στο αίμα και ανάλογα απελευθερώνει ή προσλαμβάνει γλυκόζη [Stryer L. et al., 2012].

Όσον αφορά την απορρόφηση, η ποσότητα της γλυκόζης που εισέρχεται στα ηπατικά κύτταρα μέσω των GLUT2 εξαρτάται από την συγκέντρωσή της στο αίμα και τα επίπεδα ορισμένων ορμονών στον οργανισμό. Στο ήπαρ η περίσσεια γλυκόζης χρησιμοποιείται για τη σύνθεση λιπαρών οξέων [Stryer L. et al., 2012]. Μεταφέρεται επίσης μέσω των GLUT2 στη μεμβράνη των εντεροκυττάρων [Ferraris & Ronaldo P., 2001]. Στα κύτταρα του λιπώδους ιστού, χρησιμοποιείται για να τροφοδοτήσει αντιδράσεις που συνθέτουν κάποια λιπίδια κι έχουν άλλους σκοπούς. Βασικός συντελεστής για τη σύνθεση και τη χρησιμοποίηση της γλυκόζης είναι η ινσουλίνη. Ενώ το κεντρικό νευρικό σύστημα προσλαμβάνει την γλυκόζη με ρυθμό που δεν επηρεάζεται από την συγκέντρωσή της στο αίμα αλλά

ούτε και την παρουσία της ινσουλίνης, οι σκελετικοί μύες προσλαμβάνουν γλυκόζη μόνο με την βοήθεια της ινσουλίνης [McArdle et al., 2000].

Ακόμη το ήπαρ μπορεί να εφοδιάσει το αίμα με γλυκόζη μέσω της γλυκονεογενετικής πορείας και της γλυκογονόλυσης, κατά την οποία το ένζυμο φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP) διασπά το γλυκογόνο απελευθερώνοντας 1-φωσφορική γλυκόζη (G1P). Η G1P μετατρέπεται σε 6-φωσφορική γλυκόζη, που έπειτα μετατρέπεται σε ελεύθερη γλυκόζη προς απελευθέρωση στην κυκλοφορία του αίματος [Martin et al., 1998] [Stryer L. et al., 2012]. Η μετέπειτα πορεία που θα ακολουθήσει η γλυκόζη, εξαρτάται και από την δράση των επιμέρους ενζύμων, την συσσώρευση τελικών προϊόντων που μπορεί να δρουν και ως αναστολείς, καθώς και τη κατάσταση σίτισης του οργανισμού [McArdle et al., 2000].

Τέλος, η υπερβολική ηπατική παραγωγή γλυκόζης (HGP) αποτελεί κλινικό γνώρισμα σε διαβητικούς ασθενείς [Bogardus et al., 1984]. Στον διαβήτη τύπου 2, η HGP είναι υψηλότερη στην μετα-απορροφητική κατάσταση, αποτυγχάνει να καταστέλλεται κατάλληλα από την ινσουλίνη, και προκύπτει κυρίως από υπερβολική γλυκονεογένεση, αντί γλυκογονόλυσης [Rizza, 2010].

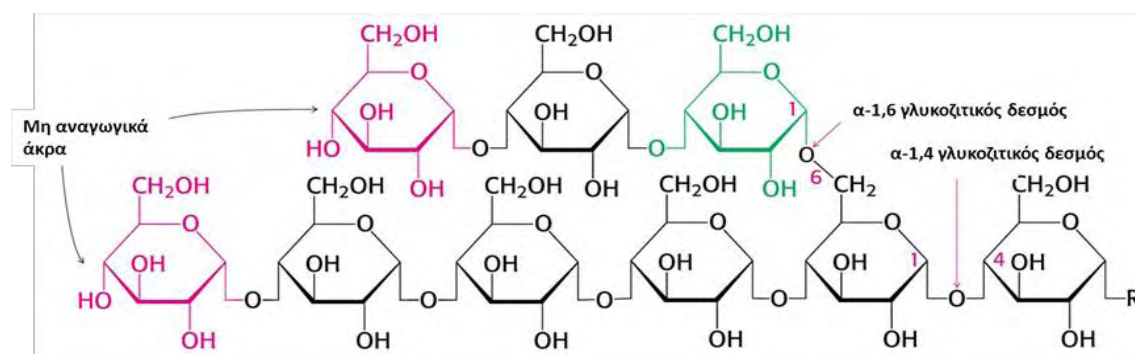


**Εικόνα 21:** Διάφοροι παράγοντες συνεισφέρουν σε αυξημένη γλυκονεογένεση από το ήπαρ στο διαβήτη: (1) αυξημένη απελευθέρωση πρόδρομων ουσιών από το λιπώδη ιστό και τους μύες (γλυκερόλη, αμινοξέα, ελεύθερα λιπαρά οξέα), (2) συσσώρευση ενδοηπατικών λιπιδίων, (3) κυτοκίνες από το κεντρικό νευρικό σύστημα (4) μεταβολή αναλογιών γλυκαγόνης-ινσουλίνης, (5) μειωμένη σηματοδότηση του υποδοχέα της ινσουλίνης στα ηπατοκύτταρα.



## 2.2 ΓΛΥΚΟΓΟΝΟ:

Το γλυκογόνο είναι ένας πολυσακχαρίτης ο οποίος παίζει ζωτικό ρόλο στην αποθήκευση ενέργειας. Αποτελεί κύρια και άμεσα κινητοποιούμενη μορφή αποθήκευσης της γλυκόζης. Δομικά, το γλυκογόνο είναι ένα πολύ μεγάλο, διακλαδισμένο πολυμερές καταλοίπων γλυκόζης (μόρια α-D-γλυκόζης), το οποίο μπορεί να αποικοδομηθεί και να αποδώσει γλυκόζη όταν χρειάζεται ενέργεια. Τα περισσότερα κατάλοιπα γλυκόζης στο γλυκογόνο συνδέονται μεταξύ τους με γλυκοζιτικούς δεσμούς α-1,4 ενώ οι διακλαδώσεις που απαντώνται περίπου σε κάθε δέκατο μόριο γλυκόζης σχηματίζονται από γλυκοζιτικούς δεσμούς α-1,6 [Stryer L. et al., 2012].



**Εικόνα 22:** Η δομή του γλυκογόνου γλυκογόνο [Stryer L. et al., 2012].

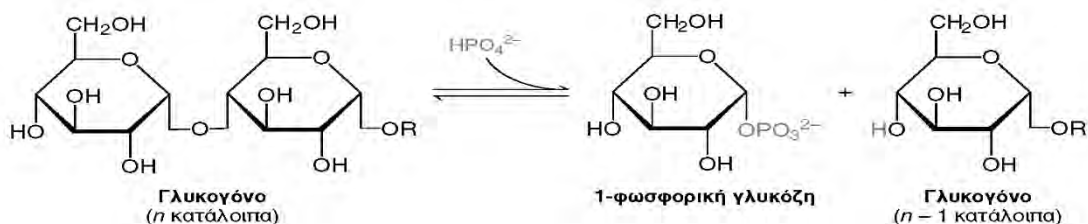
Το γλυκογόνο είναι ένα σημαντικό απόθεμα καύσιμων μορίων για διάφορους λόγους. Ο ελεγχόμενος καταβολισμός του και η απελευθέρωση γλυκόζης αυξάνουν την ποσότητα γλυκόζης που είναι διαθέσιμη μεταξύ των γευμάτων. Συνεπώς, ο μεταβολισμός του γλυκογόνου ρυθμίζει τη διατήρηση των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα. Επιπλέον η γλυκόζη από το γλυκογόνο κινητοποιείται άμεσα και επομένως είναι μια καλή πηγή ενέργειας για ξαφνική έντονη δραστηριότητα. Οι δύο κύριες θέσεις αποθήκευσης του γλυκογόνου είναι το ήπαρ και οι σκελετικοί μύες. Η συγκέντρωση του γλυκογόνου είναι υψηλότερη στο ήπαρ παρά στους μύς (10% έναντι 2% κατά βάρος), αλλά περισσότερο γλυκογόνο αποθηκεύεται στους σκελετικούς μύς συνολικά, λόγω της πολύ μεγαλύτερης μάζας τους. Το γλυκογόνο βρίσκεται στο κυτοσόλιο με τη μορφή κοκκίων με διάμετρο από 10 έως 40 nm. Στο ήπαρ, η σύνθεση και η αποικοδόμηση του γλυκογόνου ρυθμίζονται έτσι ώστε να διατηρούν στο αίμα τα επίπεδα γλυκόζης που απαιτούνται για την κάλυψη των αναγκών του οργανισμού ως συνόλου. Αντίθετα, στους μύες οι διεργασίες αυτές ρυθμίζονται για τη κάλυψη των ενεργειακών αναγκών των μυών μόνο [Stryer L. et al., 2012].

### 2.2.1 Αποικοδόμηση Γλυκογόνου:

Η μεταβολική οδός της γλυκογονόλυσης μελετήθηκε διεξοδικά από τους Carl & Gerty Cori γύρω στο 1936. Το ζεύγος Cori απομόνωσε το ένζυμο φωσφορυλάση γλυκογόνου (GP), το οποίο καταλύει την αποικοδόμηση του γλυκογόνου και την παραγωγή γλυκόζης στην διαδικασία της γλυκογονόλυσης.

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP) καταλύει τη φωσφορολυτική διάσπαση του γλυκογόνου προς απελευθέρωση 1-φωσφορικής γλυκόζης (G1P). Η GP, το καθοριστικό ένζυμο στο καταβολισμό του γλυκογόνου, διασπά το υπόστρωμά της με την προσθήκη ενός ορθοφωσφορικού ιόντος ( $\text{P}_i$ ), προς απόδοση 1-φωσφορικής γλυκόζης. Η διάσπαση ενός δεσμού με την προσθήκη του ορθοφωσφορικού αναφέρεται ως φωσφορόλυση (Εικόνα 23) [Stryer L. et al., 2012].

Η φωσφορυλάση καταλύει τη διαδοχική απομάκρυνση καταλοίπων γλυκόζης από τα μη αναγωγικά άκρα του μορίου γλυκογόνου. Ο γλυκοζιτικός δεσμός μεταξύ C-1 του τελικού καταλοίπου και C-4 του γειτονικού διασπάται από το ορθοφωσφορικό ιόν. Ειδικότερα, ο δεσμός μεταξύ του ατόμου άνθρακα C-1 και του γλυκοζιτικού οξυγόνου διασπάται από το ορθοφωσφορικό και η διαμόρφωση α στον C-1 διατηρείται [Stryer L. et al., 2012].



**Εικόνα 23:** Η αποικοδόμηση του γλυκογόνου γλυκογόνο [Stryer L. et al., 2012].

Η αντίδραση που καταλύεται από τη φωσφορυλάση είναι αντιστρεπτή *in vitro*. Σε pH 6.8, ο λόγος της ισορροπίας των ορθοφωσφορικών ιόντων προς την 1-φωσφορική γλυκόζη είναι 3.6 [Stryer L. et al., 2012].

Η φωσφορυλάση διασπά τους  $\alpha$ -1,4 γλυκοζιτικούς δεσμούς μέχρι και τέσσερα κατάλοιπα πριν από το σημείο της διακλάδωσης. Επειδή περίπου 1 στα 10 κατάλοιπα βρίσκονται σε διακλάδωση, η αποικοδόμηση του γλυκογόνου με τη φωσφορυλάση σταματάει μετά την απελευθέρωση έξι μορίων γλυκόζης ανά

διακλάδωση. Δύο επιπλέον ένζυμα, η γλυκοζιτάση δεσμού α-1,6 ένα ένζυμο αποδιακλάδωσης, καθώς και μια μεταφοράση, τα οποία ανακατασκευάζουν το γλυκογόνο για περαιτέρω αποικοδόμηση από τη φωσφορυλάση, απαιτούνται για την απομάκρυνση των μορίων που βρίσκονται πλησιέστερα στη διακλάδωση μετατρέποντας τη διακλαδισμένη δομή του γλυκογόνου σε γραμμική [Stryer L. et al., 2012].

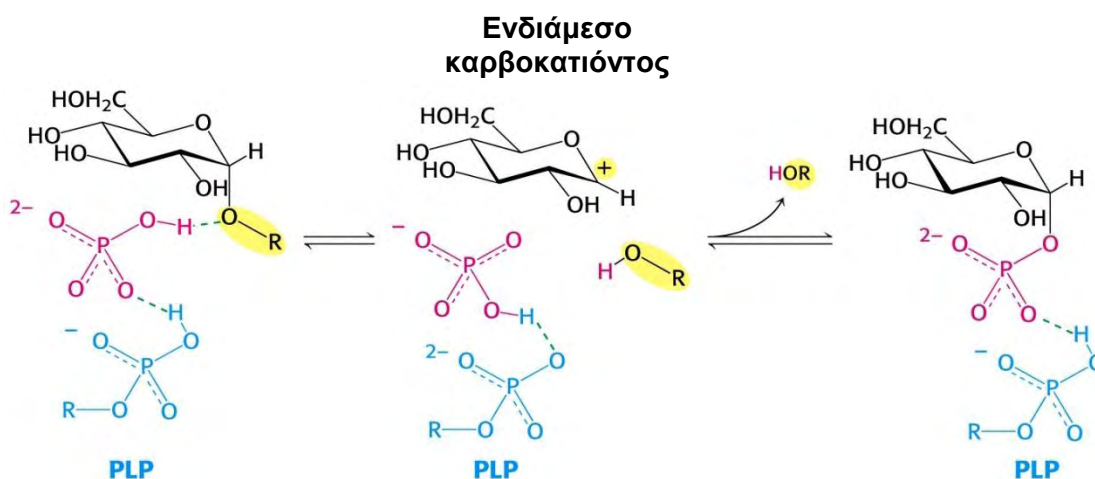
Η φωσφορολυτική διάσπαση του γλυκογόνου πλεονεκτεί ενεργειακά, διότι το απελευθερούμενο σάκχαρο είναι ήδη φωσφορυλιωμένο. Περίπου το 90% των καταλοίπων διασπώνται φωσφορολυτικά σε 1-φωσφορική γλυκόζη. Αντίθετα, μια υδρολυτική διάσπαση θα απέδιδε γλυκόζη, η οποία στη συνέχεια θα έπρεπε να φωσφορυλιωθεί με την κατανάλωση ενός μορίου ATP για να εισέλθει στη γλυκολυτική πορεία. Ένα πρόσθετο πλεονέκτημα της φωσφορολυτικής διάσπασης για τα κύτταρα των μυών είναι το γεγονός ότι η 1-φωσφορική γλυκόζη ιοντίζεται κάτω από φυσιολογικές συνθήκες και δεν είναι δυνατόν να υποστεί διάχυση προς το εξωτερικό του κυττάρου, σε αντίθεση με τη γλυκόζη [Stryer L. et al., 2012].

Τέλος, ένα ένζυμο, η πρωτεϊνική φωσφατάση 1 (PP1), παίζει καθοριστικό ρόλο στη ρύθμιση του μεταβολισμού του γλυκογόνου. Η PP1 απενεργοποιεί τη φωσφορυλάση και την κινάση της φωσφορυλάσης με αποφωσφορυλίωση των ενζύμων αυτών. Η PP1 μειώνει το ρυθμό αποικοδόμησης του γλυκογόνου, ενώ ταυτόχρονα ενεργοποιεί τη συνθάση επιταχύνοντας τη σύνθεση του γλυκογόνου. Η PP1 αποτελεί μοριακό τέχνασμα για το συντονισμό της αποθήκευσης του γλυκογόνου [Stryer L. et al., 2012].

### **2.2.2 Ο ρόλος της φωσφορικής πυριδοξάλης (PLP) στη φωσφορολυτική διάσπαση του γλυκογόνου:**

Η ιδιαίτερη πρόκληση που αντιμετωπίζει η φωσφορυλάση είναι να διασπάσει το γλυκογόνο φωσφορολυτικά παρά υδρολυτικά, με αποτέλεσμα την εξοικονόμηση ATP που απαιτείται για τη φωσφορυλίωση της ελεύθερης γλυκόζης. Η διάσπαση αυτή χρειάζεται τον αποκλεισμό του νερού από το ενεργό κέντρο. Τόσο το υπόστρωμα του γλυκογόνου όσο και η παραγόμενη 1-φωσφορική γλυκόζη (το προϊόν), έχουν διαμόρφωση α στον C-1. Αυτή η διατήρηση της διαμόρφωσης είναι ένα πολύτιμο στοιχείο για τον καταλυτικό μηχανισμό της GP. Μια άμεση προσβολή της φωσφορικής ομάδας στον C-1 ενός

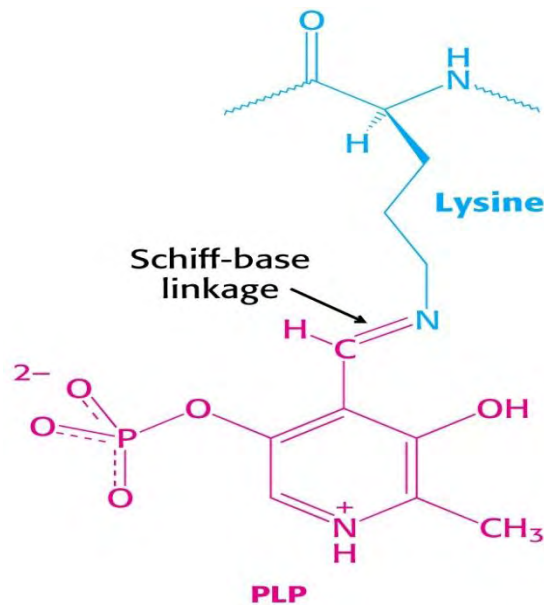
σακχάρου θα αναστρέψει τη διαμόρφωση στον άνθρακα αυτό. Το γεγονός ότι η σχηματιζόμενη 1-φωσφορική γλυκόζη έχει διαμόρφωση α αντί για β, δείχνει ότι απαιτείται ένας άρτιος αριθμός βημάτων (συνήθως δύο). Το πιθανότερο ενδεχόμενο είναι ότι σχηματίζεται ένα ενδιάμεσο καρβοκατίον, όπως και στην υδρόλυση των πολυσακχαριτών βακτηριακών κυτταρικών τοιχωμάτων που καταλύεται από την λυσοζύμη (Εικόνα 24) [Stryer L. et al., 2012].



**Εικόνα 24: Μηχανισμός δράσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου.** Μια προσδεμένη ομάδα  $\text{HPO}_4^{2-}$  (κόκκινο) ευνοεί τη διάσπαση του γλυκοζιτικού δεσμού με προσφορά ενός πρωτονίου στην αποχωρούσα γλυκόζη (μαύρο). Η αντίδραση αυτή έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό ενός καρβοκατιόντος και ευνοείται με τη μεταφορά ενός πρωτονίου από την πρωτονιωμένη φωσφορική ομάδα της δεσμευμένης φωσφορικής πυριδοξάλης (μπλε). Η σύζευξη του καρβοκατιόντος και του ορθοφωσφορικού έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό της 1-φωσφορικής γλυκόζης [Stryer L. et al., 2012].

Μια δεύτερη ένδειξη για την κατανόηση του καταλυτικού μηχανισμού της GP, είναι η απαίτηση για την ύπαρξη της 5'-φωσφορικής πυριδοξάλης (PLP), ενός παραγώγου της πυριδοξίνης (βιταμίνη B6). Η αλδεϋδική ομάδα του συνενζύμου αυτού σχηματίζει μια βάση Schiff με την πλευρική αλυσίδα μιας συγκεκριμένης λυσίνης του ενζύμου (Εικόνα 25). Τα αποτελέσματα δομικών μελετών υποδηλώνουν ότι η αντιδρώσα ορθοφωσφορική ομάδα καταλαμβάνει μια θέση μεταξύ της 5'-φωσφορικής ομάδας της PLP και του υποστρώματος του γλυκογόνου. Η 5'-φωσφορική ομάδα της PLP δρα σε συνδυασμό με το ορθοφωσφορικό λειτουργώντας ως δότης πρωτονίων και στη συνέχεια ως δέκτης πρωτονίων (δηλαδή, ως ένας γενικός οξοβασικός καταλύτης). Το

ορθοφωσφορικό (με τη μορφή  $\text{HPO}_4^{2-}$ ) δίνει ένα πρωτόνιο στο οξυγόνο που είναι συνδεδεμένο στον άνθρακα 4 της αποχωρούσας αλυσίδας γλυκογόνου, και συγχρόνως αποκτά ένα πρωτόνιο από την PLP. Το ενδιάμεσο καρβοκατιόν, που σχηματίζεται στο βήμα αυτό, προσβάλλεται στη συνέχεια από το ορθοφωσφορικό ανιόν προς σχηματισμό φωσφορικής γλυκόζης δεσμού α-1, με την επακόλουθη επιστροφή ενός ατόμου υδρογόνου στη φωσφορική πυριδοξάλη. Η απαίτηση να αποκλείεται το νερό από το ενεργό κέντρο δικαιολογεί τον ειδικό ρόλο της PLP στη διευκόλυνση της φωσφορολυτικής διάσπασης του γλυκογόνου [Stryer L. et al., 2012].



**Εικόνα 25: Δεσμός βάσης Schiff της PLP.** Η PLP (κόκκινο) σχηματίζει μια βάση Schiff με ένα κατάλοιπο λυσίνης (μπλε) στο ενεργό κέντρο της φωσφορυλάσης [Stryer L. et al., 2012].

**3<sup>ο</sup> ΜΕΡΟΣ**  
**ΦΩΣΦΟΡΥΛΑΣΗ**  
**ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ**

### 3.1 ΓΕΝΙΚΑ:

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP) είναι ένα αλλοστερικό ένζυμο κι αποτελεί το κυριότερο ένζυμο κινητοποίησης του γλυκογόνου, καταλύοντας την αντίδραση φωσφορύλιωσής του και απελευθερώνοντας 1-φωσφορική γλυκόζη.

Στον οργανισμό υπάρχουν τρεις ισομορφές του ενζύμου, η φωσφορυλάση του εγκεφάλου, του ήπατος και των μυών, ανάλογες των ιστών στους οποίους εκφράζονται κατά προτίμηση [Rath V.L. et al., 1987] [Johnson L.N., 1992]. Η ηπατική και η μυϊκή φωσφορυλάση είναι κατά προσέγγιση 90% παρόμοιες στην αλληλουχία αμινοξέων. Κάθε ισομορφή έχει διαφορετικό ρόλο στον μεταβολισμό του γλυκογόνου. Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου των μυών παρέχει ενέργεια στους μυς, η ηπατική φωσφορυλάση παράγει γλυκόζη για χρήση από άλλους ιστούς, ενώ η ισομορφή του εγκεφάλου παρέχει γλυκόζη κατά περιόδους υποξείας ή έντονης υπογλυκαιμίας. Οι δύο ισομορφές, η μυϊκή και αυτή του εγκεφάλου, παρέχουν γλυκόζη για ενεργειακή αποκατάσταση των ίδιων των ιστών. Γι' αυτό στους ιστούς αυτούς απουσιάζει το υδρολυτικό ένζυμο, η φωσφατάση της 6- φωσφορικής γλυκόζης, το οποίο διασπά τη φωσφορική ομάδα της φωσφορυλιωμένης γλυκόζης που παράγεται από την αποικοδόμηση του γλυκογόνου προς σχηματισμό ελεύθερης γλυκόζης και ορθοφωσφορικού. Αντίθετα, η ηπατική φωσφορυλάση έχει ομοιοστατικό ρόλο, καθώς η ισομορφή αυτή ρυθμίζει την απελευθέρωση γλυκόζης για τον οργανισμό ως σύνολο [Oikonomakos N.G. et al., 2000] [Stryer L. et al., 2012].

Δομικά, η GP είναι μία ομοδιμερής πρωτεΐνη, αποτελούμενη από δυο πανομοιότυπες υπομονάδες των 97kd (842 αμινοξέα). Κάθε υπομονάδα είναι συμπαγώς αναδιπλωμένη σε μια αμινο-τελική δομική περιοχή (≈480 κατάλοιπα) και μια καρβοξυ-τελική δομική περιοχή (≈360 κατάλοιπα). Κάθε καταλυτικό κέντρο, σε κάθε υπομονάδα, περιέχει μια ομάδα συνενζύμου (PLP), παράγωγο της πυριδοξίνης (βιταμίνη B6), συνδεδεμένη με τη λυσίνη (Lys) 680 του ενζύμου [Oikonomakos N.G. et al., 1992] [Stryer L. et al., 2012]. Στους σκελετικούς μύες η GP βρίσκεται σε τόσο μεγάλες συγκεντρώσεις ώστε να υπάρχει περισσότερη PLP συνδεδεμένη με την GP, απ' ότι σε όλα τα ένζυμα μαζί που εξαρτώνται από την βιταμίνη B6. Βάση διαφόρων πειραμάτων που έγιναν στο παρελθόν, αποδείχτηκε το γεγονός ότι η παρουσία της 5'-φωσφορικής ομάδας της PLP είναι απαραίτητη για την δραστικότητα του ενζύμου [Oikonomakos N.G. et al., 1992]. Η κάθε υπομονάδα περιέχει χαρακτηριστικές λειτουργικές περιοχές όπως η καταλυτική, οι αλλοστερικές περιοχές (καρβοξυ-τελική και αμινο-τελική δομική περιοχή) αλλά και η θέση πρόσδεσης του γλυκογόνου [Stryer L. et al., 2012].

Τόσο στους μύες όσο και στο ήπαρ, η GP υπάρχει σε δύο αλληλομετατρέπόμενες μορφές: την αποφωσφορυλιωμένη χαμηλής δραστηριότητας και χαμηλής συγγένειας υποστρώματος μορφή (GPb) και την φωσφορυλιωμένη στη Ser14 υψηλής δραστηριότητας και υψηλής συγγένειας υποστρώματος μορφή GPa. Και στις δύο μορφές, αλλοστερικοί τροποποιητές μπορούν να προωθήσουν την ισορροπία μεταξύ μιας λιγότερο ενεργούς κατάστασης T και μιας πιο ενεργούς κατάστασης R [Oikonomakos N.G. et al., 2000] [Oikonomakos N.G. et al., 2002].

Η κατάλυση της αντίδρασης φωσφορόλυσης του γλυκογόνου από την GP γίνεται στο καταλυτικό της κέντρο το οποίο εντοπίζεται σε μια βαθιά σχισμή που σχηματίζεται με κατάλοιπα ανάμεσα στην καρβοξυ-τελική και την αμινο-τελική περιοχή κάθε υπομονάδας. Στο ενεργό κέντρο τα υποστρώματα, γλυκογόνο και ορθοφωσφορικό ανιόν, έρχονται σε γειτνίαση ώστε να επιτευχθεί η φωσφορόλυση του γλυκογόνου, και όχι η υδρόλυση του, αποκλείοντας τα μόρια του H<sub>2</sub>O, με τη βοήθεια της PLP. Δύο είναι τα σημαντικότερα σημεία του μηχανισμού κατάλυσης από την GP. Το πρώτο είναι η διατήρηση της ανωμέρειας του γλυκογόνου στο προϊόν (1-φωσφορική α-D-γλυκόζη) (α-ανωμερές), που οφείλεται στο σχηματισμό του ανωμερικού καρβοκατιόντος και την κατάλληλα προσανατολισμένη (από κάτω) πυρηνόφιλη προσβολή του ορθοφωσφορικού ανιόντος. Το δεύτερο σημείο είναι η απαίτηση της παρουσίας του συνενζύμου, φωσφορική πυριδοξάλη (PLP), που είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένη με την ε-αμινομάδα της λυσίνης 680. Σύμφωνα με μελέτες μηχανισμού της κατάλυσης της αντίδρασης φαίνεται το συνένζυμο να δρα σαν δότης αλλά και δέκτης πρωτονίων κατά την κατάλυση [McLaughlin 1984].

Η διμερής φωσφορυλάση των σκελετικών μυών υπάρχει σε δυο αλληλομετατρέπόμενες μορφές : μια συνήθως ενεργό φωσφορυλάση a και μια συνήθως ανενεργό φωσφορυλάση b (Εικόνα 27). Η φωσφορυλάση a και η φωσφορυλάση b διαφέρουν κατά μια φωσφορική ομάδα σε κάθε υπομονάδα. Η φωσφορυλάση b μετατρέπεται στη φωσφορυλάση a όταν αυτή φωσφορυλιώνεται σε ένα απλό κατάλοιπο σερίνης (Ser 14) σε κάθε υπομονάδα. Το ρυθμιστικό ένζυμο κινάση της φωσφορυλάσης καταλύει την ομοιοπολική τροποποίηση. Ακόμη, αυξημένα επίπεδα επινεφρίνης (μιας κατεχολαμίνης που διεγείρει την αποικοδόμηση του γλυκογόνου στους μύες και το ήπαρ, ως αποτέλεσμα φόβου ή έξαψης λόγω άσκησης) και η ηλεκτρική διέγερση των μυών έχουν ως αποτέλεσμα τη φωσφορυλίωση του ενζύμου στη μορφή της φωσφορυλάσης a [Stryer L. et al., 2012].

Φυσιολογικά η δραστηριότητα της GP ελέγχεται με ομοιοπολική τροποποίηση από το ένζυμο κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, μια πολύ μεγάλη πρωτεΐνη στους σκελετικούς μυς. Η κινάση μετά από έναν ορμονικό



καταρράκτη αντιδράσεων (καταρράκτης της κυκλικής AMP) και την ενεργοποίηση μέσω ασβεστίου (δέσμευση  $\text{Ca}^{2+}$ ), προκαλεί φωσφορυλίωση της φωσφορυλάσης στη σερίνη 14 οδηγώντας στο σχηματισμό της GPa (φωσφορυλιωμένη GP). Αντίθετα μία ειδική πρωτεϊνική φωσφατάση 1G (PP-G1) ή πρωτεϊνική φωσφατάση 1 (PP1), υδρολύει τον φωσφοεστερικό δεσμό, υδρολύει το φωσφορυλιωμένο κατάλοιπο σερίνης αποφωσφορυλιώνοντας τη φωσφορυλάση α, και έτσι η φωσφορυλάση μεταπίπτει στη μορφή GPb (μη φωσφορυλιωμένη GP) [Rath et al., 2000] [Stryer L. et al., 2012].

### 3.2 ΑΛΛΟΣΤΕΡΙΚΕΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ:

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου ρυθμίζεται με αντιστρεπτή φωσφορυλίωση ως απόκριση σε ορμονικά σήματα ινσουλίνης, γλυκαγόνης και επινεφρίνης, όπως επίσης με διάφορους αλλοστερικούς τροποποιητές οι οποίοι σηματοδοτούν την ενεργειακή κατάσταση του κυττάρου [Stryer L. et al., 2012].

Ο συντονισμός των ενζυμικών μηχανισμών και των αλληλεπιδράσεων που κατευθύνουν τις διάφορες διεργασίες γίνεται με την βοήθεια ρυθμιστικών ενζύμων, η λειτουργική δομή των οποίων τους επιτρέπει να προσαρμόζουν την καταλυτική τους δράση ανάλογα με τις ανάγκες του κυττάρου και μπορεί να αναστέλλουν ή να ενεργοποιούν ένα συγκεκριμένο ένζυμο. Σύμφωνα με τους Monod, Changeux και Wyman, ως αλλοστερικές χαρακτηρίζονται οι πρωτεΐνες που διαθέτουν τουλάχιστον δυο διακριτά κέντρα σύνδεσης, το καταλυτικό και το αλλοστερικό. Στο καταλυτικό κέντρο, το οποίο ευθύνεται για την βιολογική δράση της πρωτεΐνης, συνδέεται το υπόστρωμα, ενώ στο αλλοστερικό συνδέεται αντιστρεπτά και με μεγάλη εξειδίκευση ένας άλλος μεταβολίτης, ο αλλοστερικός τροποποιητής. Ο σχηματισμός του συμπλόκου ένζυμο - αλλοστερικός τροποποιητής προκαλεί μια διακριτή, αντιστρεπτή μεταβολή της μοριακής δομής της πρωτεΐνης, η οποία ονομάζεται αλλοστερική μετάπτωση. Αυτή τροποποιεί τις ιδιότητες του ενεργού κέντρου, χωρίς να ενεργοποιεί κάποια αντίδραση που να εμπλέκει τον ίδιο τον τροποποιητή [Monod et al., 1963].

Η δημιουργία του συμπλέγματος ενζύμου - αλλοστερικού τροποποιητή δεν ενεργοποιεί κάποια χημική αντίδραση, αλλά προκαλεί μία ελαφρά τροποποίηση στη δομή του ενζύμου. Αυτή η τροποποίηση ονομάζεται αλλοστερική μετάπτωση και μεταβάλλει τη χωροδιάταξη του ενεργού κέντρου, με αποτέλεσμα να μεταβάλλεται η βιολογική δράση του ενζύμου. Ο αλλοστερικός τροποποιητής δε δεσμεύεται στο ίδιο κέντρο με το υπόστρωμα ούτε συμμετέχει σε χημική

αντίδραση, οπότε δεν είναι απαραίτητο η δομή του να μοιάζει με τη δομή του υποστρώματος.

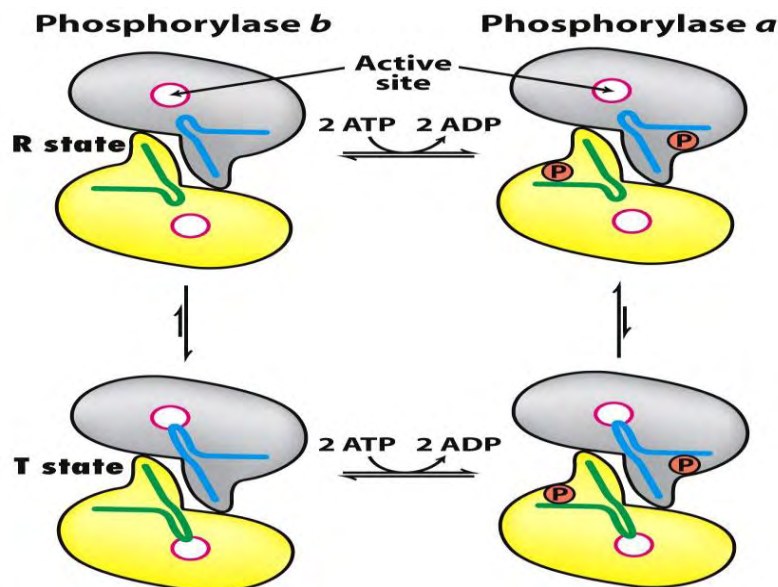
Γενικά, θεωρείται ότι η μεγάλη εκλεκτικότητα που παρουσιάζει οποιαδήποτε αλλοστερική αλληλεπίδραση απορρέει αποκλειστικά από τη συγκεκριμένη δομή του ίδιου του μορίου της πρωτεΐνης. Αυτή η δομή είναι που του επιτρέπει να υποβληθεί σε μια ιδιαίτερη, διακριτή και αντιστρεπτή αλλαγή στη διαμόρφωσή του που επάγεται από τη σύνδεση του αλλοστερικού τροποποιητή [Monod et al., 1963].

Οι αλλοστερικές αλληλεπιδράσεις διακρίνονται σε ομοτροπικές, μεταξύ ταυτόσημων ενώσεων και ετεροτροπικές, μεταξύ διαφορετικών ενώσεων. Η GP αποτελεί ένα από τα πιο γνωστά παραδείγματα αλλοστερικού ενζύμου. Οι αλλοστερικές πρωτεΐνες είναι ολιγομερή, τα μονομερή των οποίων συνδέονται με τέτοιο τρόπο ώστε όλα να καταλαμβάνουν ισοδύναμες θέσεις. Δηλαδή, το μόριο να έχει έναν τουλάχιστον άξονα συμμετρίας. Το μονομερές απαντάται σε δυο τουλάχιστον πρωτεϊνικές διαμορφώσεις, την T και την R μορφή, οι οποίες βρίσκονται σε ισορροπία που καθορίζεται από την αλλοστερική σταθερά L. Η συμμετρία στα μονομερή διατηρείται κατά τη διάρκεια της αλλοστερικής μετάπτωσης από τη μια διαμόρφωση στην άλλη, ενώ η συγγένειά τους με συγκεκριμένους υποκαταστάτες μεταβάλλεται. Η σύνδεση του υποστρώματος σε οποιοδήποτε μονομερές δεν επηρεάζει κατά κανένα τρόπο την σύνδεσή του στα υπόλοιπα μονομερή (δηλαδή οι μικροσκοπικές σταθερές διάστασης στα σύμπλοκα μεταξύ μονομερών T ή R διαμόρφωσης και υποστρώματος είναι αντίστοιχα ίδιες) [Monod et al., 1965].

Η παρουσία ενός συγκεκριμένου υποκαταστάτη μετατοπίζει την ισορροπία μεταξύ των δυο διαμορφώσεων με αποτέλεσμα την εμφάνιση ομοτροπικών και ετεροτροπικών αλληλεπιδράσεων. Οι θετικές συνεργιστικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των υπομονάδων στο ενζυμικό μόριο ερμηνεύονται με βάση τη μετατόπιση της ισορροπίας προς την κατεύθυνση της R διαμόρφωσης, η οποία συνδέει κατά προτίμηση το υπόστρωμα [Monod et al., 1965].

Συνέπεια της σύνδεσης αυτής είναι η αύξηση ή αντίστοιχα η μείωση της αλλοστερικής σταθεράς και η τροποποίηση στη μορφή της γραφικής απεικόνισης της ενζυμικής ταχύτητας ως προς τη συγκέντρωση του υποστρώματος, σε περισσότερο ή λιγότερο σιγμοειδή. Η τροποποίηση αυτή γίνεται ανάλογα με το αν η αλλοστερική μετάπτωση προκαλείται από αναστολέα ή ενεργοποιητή του ενζύμου. Σημειώνεται ότι η σιγμοειδής συμπεριφορά αποτελεί χαρακτηριστικό γνώρισμα των αλλοστερικών πρωτεϊνών [Monod et al., 1965].

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου υπακούει στο μοντέλο αλλοστερικών ενζύμων των Monod, Changeux και Wyman [Οικονομακος N.G. et al., 1992]. Έτσι, κάθε μια από τις δύο μορφές της (a και b) βρίσκεται σε ισορροπία μεταξύ μιας ενεργού χαλαρής κατάστασης R και μιας πολύ λίγο ενεργού τεταμένης κατάστασης T, όμως η ισορροπία για την φωσφορυλάση a ευνοεί την κατάσταση R, ενώ η ισορροπία για τη φωσφορυλάση b ευνοεί την κατάσταση T (Εικόνες 26 και 27). Η μετάβαση από την κατάσταση T (αντιπροσωπεύεται από τη φωσφορυλάση b) στην κατάσταση R (αντιπροσωπεύεται από τη φωσφορυλάση a) συνδέεται με δομικές αλλαγές στις α- έλικες, οι οποίες μετακινούν μια θηλιά έξω από το ενεργό κέντρο της κάθε υπομονάδας. Έτσι, η κατάσταση T είναι λιγότερο ενεργός διότι το καταλυτικό κέντρο είναι μερικώς παρεμποδιζόμενο. Στην κατάσταση R το καταλυτικό κέντρο είναι περισσότερο προσβάσιμο και η θέση δέσμησης για το ορθοφωσφορικό είναι καλά οργανωμένη [Stryer L. et al., 2012].



**Figure 21.11**  
*Biochemistry, Seventh Edition*  
 © 2012 W. H. Freeman and Company

**Εικόνα 26: Ρύθμιση της φωσφορυλάσης.** Η φωσφορυλάση a και η φωσφορυλάση b βρίσκονται σε ισορροπία μεταξύ μιας ενεργού κατάστασης R και μιας λιγότερο ενεργού κατάστασης T. Η φωσφορυλάση b είναι συνήθως ανενεργός διότι η ισορροπία ευνοεί την κατάσταση T. Η φωσφορυλάση a είναι συνήθως ενεργός διότι η ισορροπία ευνοεί τη κατάσταση R. Οι ρυθμιστικές δομές δείχνονται με μπλε και πράσινο [Stryer L. et al., 2012].

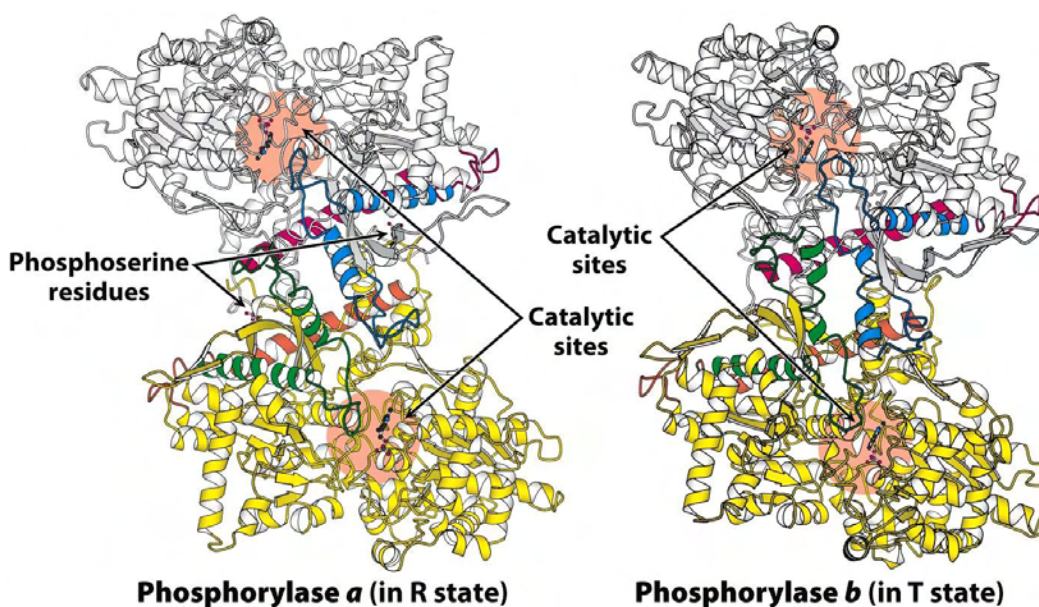


Figure 21.10  
*Biochemistry, Seventh Edition*  
 © 2012 W. H. Freeman and Company

**Εικόνα 27: Δομή της φωσφορυλάσης a και της φωσφορυλάσης b.** Η φωσφορυλάση a φωσφορυλιώνεται στη σερίνη 14 κάθε υπομονάδας. Η τροποποίηση αυτή ευνοεί τη δομή της πλέον ενεργού κατάστασης R. Η μία υπομονάδα δείχνεται με λευκό, ενώ οι έλικες και οι βρόχοι, που είναι σημαντικοί για τη ρύθμιση, με μπλε και κόκκινο. Η άλλη υπομονάδα δείχνεται με κίτρινο και οι ρυθμιστικές δομές με πορτοκαλί και πράσινο. Η φωσφορυλάση b δεν φωσφορυλιώνεται και υπάρχει κυρίως στην κατάσταση T [Stryer L. et al., 2012].

Η μυϊκή φωσφορυλάση b είναι ενεργός μόνο παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων AMP, η οποία δεσμεύεται σε μια θέση δέσμευσης νουκλεοτιδίου και σταθεροποιεί τη στερεοδιάταξη της φωσφορυλάσης b στην κατάσταση R (Εικόνα 28). Η ATP δρα ως ένας αρνητικός αλλοστερικός τελεστής, ανταγωνιζόμενος την AMP, ευνοώντας έτσι την κατάσταση T. Επομένως η μετάπτωση της φωσφορυλάσης b από την κατάσταση T στην κατάσταση R και αντιστρόφως, ελέγχεται από το ενεργειακό φορτίο του μυϊκού κυττάρου. Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες η φωσφορυλάση b είναι ανενεργός λόγω των ανασταλτικών επιδράσεων της ATP και της 6-φωσφορικής γλυκόζης. Αντίθετα η φωσφορυλάση a είναι πλήρως ενεργός, ανεξάρτητα από τα επίπεδα της AMP, της ATP και της 6-φωσφορικής γλυκόζης. Στους μύες που βρίσκονται σε ηρεμία, σχεδόν όλο το ένζυμο βρίσκεται στην ανενεργό μορφή b. Η απουσία της φωσφατάσης της 6-φωσφορικής γλυκόζης στους μύς εξασφαλίζει την παραμονή της 6-φωσφορικής γλυκόζης που παράγεται από το γλυκογόνο μέσα στο κύτταρο για μετασχηματισμό σε ενέργεια [Stryer L. et al., 2012].

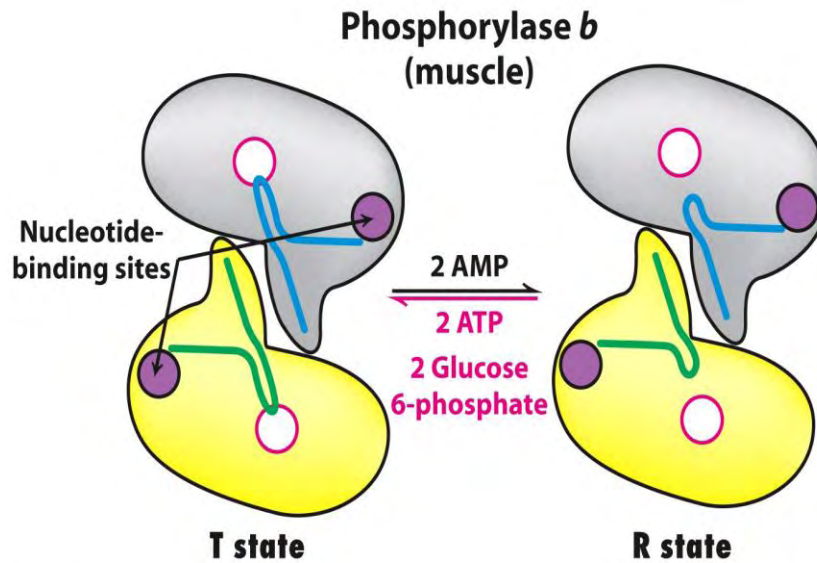
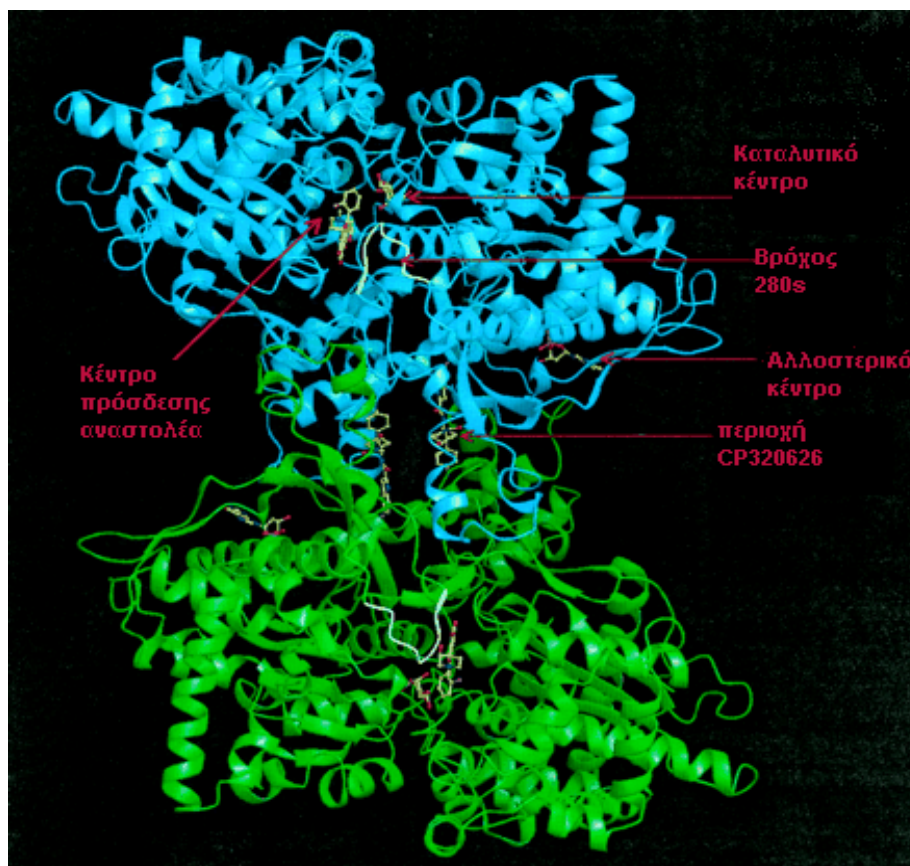


Figure 21.12  
Biochemistry, Seventh Edition  
© 2012 W. H. Freeman and Company

**Εικόνα 28: Αλλοστερική ρύθμιση της μυϊκής φωσφορυλάσης.** Ένα χαμηλό ενεργειακό φορτίο, που αντιπροσωπεύεται από την υψηλή συγκέντρωση της AMP, ευνοεί τη μετάβαση στη μορφή R [Stryer L. et al., 2012].

Η δραστηριότητα της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου ελέγχεται και από αναστολείς και αλλοστερικούς τροποποιητές που συνδέονται σε ειδικά κέντρα σύνδεσης, στο καταλυτικό κέντρο, το κέντρο αναστολής και το αλλοστερικό κέντρο (Εικόνα 29). Στο καταλυτικό κέντρο συνδέεται η γλυκόζη, φυσιολογικός αναστολέας, που προκαλεί αναστολή εμποδίζοντας τη σύνδεση του υποστρώματος και προκαλώντας μετατόπιση της ισορροπίας προς την λιγότερο δραστήρια T διαμόρφωση. Στο κέντρο αναστολής (κέντρο πουρινών) συνδέονται νουκλεοσίδες και νουκλεοτίδια (το τμήμα των βάσεων) προκαλώντας μπλοκάρισμα του καταλυτικού κέντρου μετατοπίζοντας την ισορροπία προς την T διαμόρφωση. Τέλος, στο αλλοστερικό κέντρο συνδέεται η 6-φωσφορική γλυκόζη προκαλώντας μετατόπιση προς την T κατάσταση, το AMP που προκαλεί ενεργοποίηση μετατοπίζοντας την ισορροπία προς την R κατάσταση και το ATP που απλώς ανταγωνίζεται το AMP [Oikonomakos N.G., 2001].

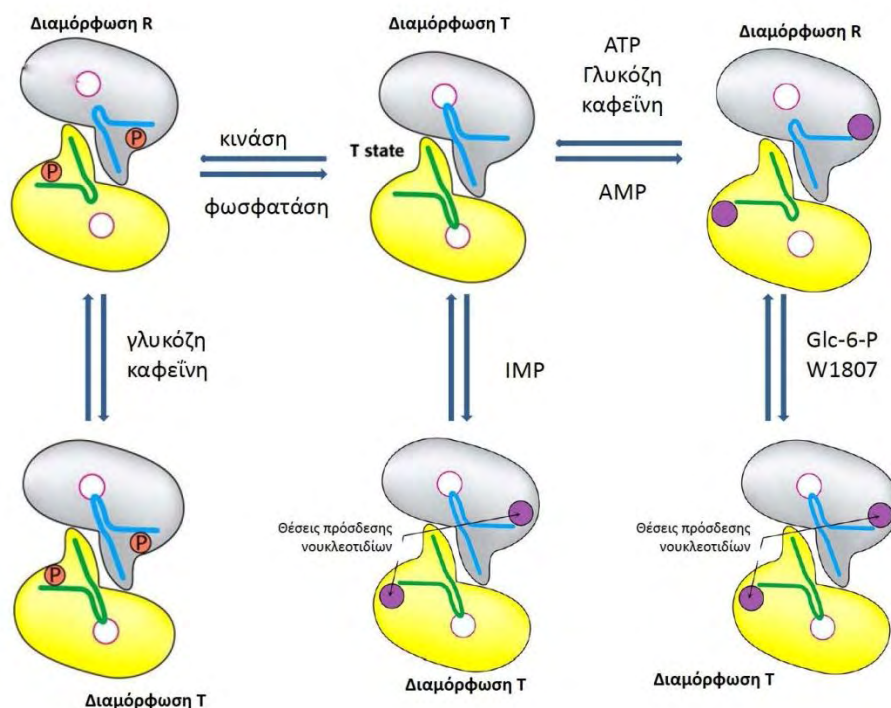




**Εικόνα 29: Κρυσταλλική δομή της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (διμερές μόριο GPb).** Οι αναστολείς είναι προσδεσμένοι στα κέντρα του ενζύμου, ενώ υποδεικνύεται και η θέση του βρόχου 280s [Oikonomakos N.G., 2000a].

Η ανενεργός μορφή της φωσφορυλάσης b μπορεί να ενεργοποιηθεί από την συνεργιστική σύνδεση του AMP και κάποιων αναλόγων του (όπως το IMP) και να ανασταλεί από το ATP, το ADP, την α-D-6-φωσφορική γλυκόζη (G6P), την UDP-Glc, πουρίνες όπως η καφεΐνη και από την D-γλυκόζη. Υψηλές συγκεντρώσεις ανιόντων καθώς και συγκεκριμένοι οργανικοί διαλύτες μπορούν *in vitro* να προκαλέσουν ενεργοποίηση του ενζύμου. Παρόμοια δράση ασκούν η πρωταμίνη, η σπερμίνη και άλλες πολυαμίνες, τα φθοροανιόντα καθώς και τα δισθενή κατιόντα  $\text{Ca}^{2+}$  και  $\text{Mg}^{2+}$  [Oikonomakos N.G. et al., 1992].

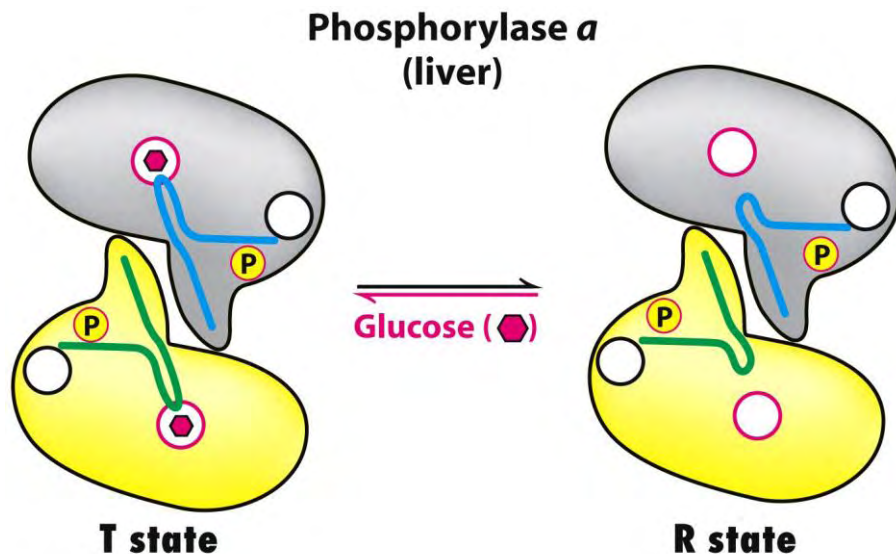
Η μετατροπή της GPb σε GPa έχει σαν αποτέλεσμα την δημιουργία ενός ενζύμου που είναι ενεργό απουσία AMP. Η GPa επιδεικνύει μεγαλύτερη συγγένεια για το AMP συγκριτικά με την GPb (100 φορές μεγαλύτερη) αλλά μικρότερη συγγένεια για τα ATP, ADP και την G6P (Εικόνα 30) [Johnson et al., 1989].



**Εικόνα 30:** Ρύθμιση της μυϊκής φωσφορυλάσης [Stryer L. et al., 2012].

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου του ήπατος (HLGP), ένα ομοδιμερές 846 κατάλοιπων ανά υπομονάδα, ρυθμίζεται αλλοστερικά από την σύνδεση τελεστών και με φωσφορυλίωση στη Ser14. Οι αλλοστερικοί τελεστές και η φωσφορυλίωση μεταβάλλουν τη δραστηριότητα του ενζύμου σταθεροποιώντας είτε την ενεργό (R) είτε την ανενεργό διαμόρφωση (T). Το φωσφορυλιωμένο ένζυμο, HLGP<sub>a</sub>, μπορεί να υιοθετεί την ενεργό ή την ανενεργό διαμόρφωση. Το μη φωσφορυλιωμένο ένζυμο, HLGP<sub>b</sub>, εμφανίζει χαμηλή δραστηριότητα, αλλά μπορεί να ενεργοποιηθεί ασθενώς με AMP. Η ενεργή διαμόρφωση (R) σταθεροποιείται με φωσφορυλίωση στη Ser14 και με δέσμευση AMP. Η ανενεργή διαμόρφωση (T) σταθεροποιείται με αποφωσφορυλίωση, και με δέσμευση ετεροκυκλικών ενώσεων, όπως η καφεΐνη. Η γλυκόζη δεσμεύεται στην καταλυτική περιοχή μέσω των αλληλεπιδράσεων της με Asp283 και Asn284, που δένουν το βρόχο 280s στη διαμόρφωση T, η καφεΐνη προσδένεται κοντά στην καταλυτική περιοχή, και το AMP δεσμεύεται σε μια ξεχωριστή αλλοστερική θέση. Η γλυκόζη λειτουργεί συνεργικά με την καφεΐνη για την αναστολή της φωσφορυλάσης [Kasvinsky P.J., 1981] [Johnson L.N., 1992].

Η ρύθμιση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου του ήπατος, διαφέρει σημαντικά από εκείνη των μυών, λόγω του ρόλου του ήπατος στην ομοιοστασία της γλυκόζης για τον οργανισμό ως συνόλου. Σε αντίθεση με το ένζυμο των μυών, η ηπατική φωσφορυλάση α, αλλά όχι η β, παρουσιάζει τη μεγαλύτερη ανταπόκριση σε μετάπτωση από την κατάσταση T στην R. Η δέσμευση της γλυκόζης μετακινεί την αλλοστερική ισορροπία της φωσφορυλάσης α από την κατάσταση (R στην T, απενεργοποιώντας το ένζυμο. Έτσι, το γλυκογόνο δεν κινητοποιείται όταν η γλυκόζη είναι ήδη σε αφθονία (Εικόνα 31). Σε αντίθεση με το μυϊκό ένζυμο, η ηπατική φωσφορυλάση δεν είναι ευαίσθητη σε ρύθμιση από την AMP διότι το ήπαρ δεν υφίσταται τις εντυπωσιακές αλλαγές στο ενεργειακό φορτίο, όπως συμβαίνει σε έναν συσπώμενο μυ [Stryer L. et al., 2012].



**Figure 21.13**  
*Biochemistry, Seventh Edition*  
© 2012 W. H. Freeman and Company

**Εικόνα 31: Αλλοστερική ρύθμιση της ηπατικής φωσφορυλάσης.** Η πρόσδεση της γλυκόζης στη φωσφορυλάση α μετατοπίζει την ισορροπία προς την κατάσταση T και απενεργοποιεί το ένζυμο [Stryer L. et al., 2012].

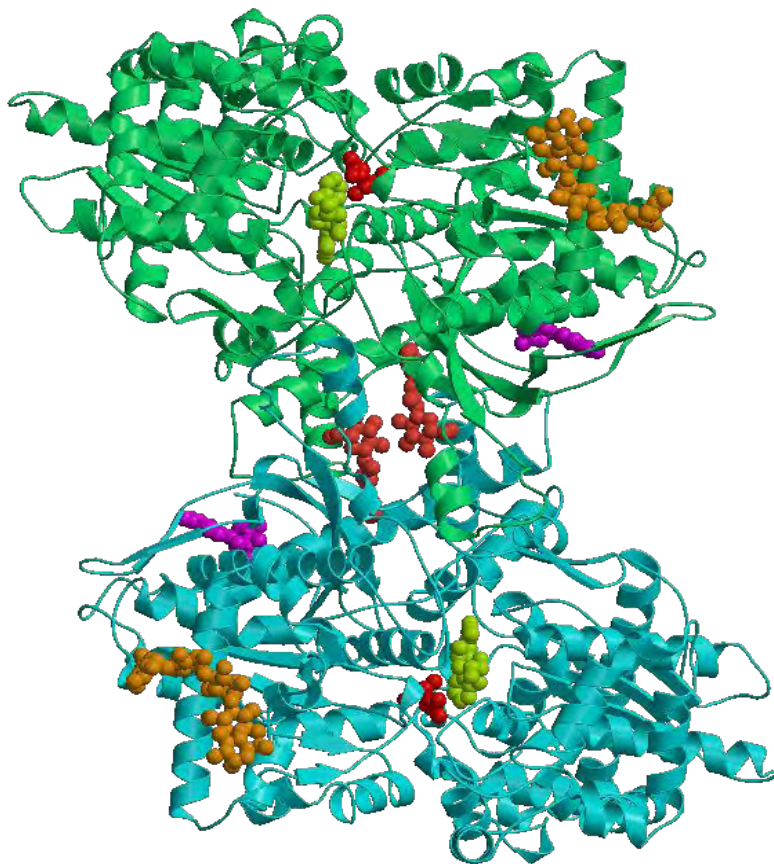


### 3.3 ΚΡΥΣΤΑΛΛΙΚΗ ΔΟΜΗ ΤΗΣ GP:

Οι κρυσταλλικές δομές της GP<sub>a</sub> και της GP<sub>b</sub> (T και R διαμόρφωση) προσδιορίστηκαν γύρω στο 1990. Οι μελέτες αυτές απέδειξαν πως οι κρύσταλλοι της GP περιέχουν μεγάλα ποσοστά ύδατος (γύρω στο 48%), το οποίο είναι εγκλωβισμένο μέσα σε τρισδιάστατα πλέγματα καναλιών. Κι αυτό συμβαίνει γιατί η διάταξη των κρυστάλλων των πρωτεϊνικών μορίων είναι τέτοια ώστε να δημιουργούνται επιμήκη κανάλια διαμέτρου 20 Å κατά μήκος του άξονα του κρυστάλλου. Τα κανάλια αυτά επιτρέπουν σε μικρά μόρια να διαχέονται στον κρύσταλλο και να φτάνουν στα κέντρα σύνδεσής τους [Barford & Johnson, 1989]. Βιοχημικές και κρυσταλλογραφικές μελέτες απέδειξαν επίσης την ύπαρξη επτά κέντρων σύνδεσης:

- Κέντρο φωσφορυλίωσης της Ser 14 (P)
- Αλλοστερικό κέντρο (N)
- Καταλυτικό κέντρο (C)
- Αποθηκευτικό κέντρο (κέντρο του γλυκογόνου) (G)
- Νουκλεοζιτικό κέντρο (κέντρο αναστολής) (I)
- Νέο αλλοστερικό κέντρο (κέντρο σύνδεσης εν δυνάμει φαρμάκων)
- Κέντρο σύνδεσης κερκετίνης

Η κάθε υπομονάδα του διμερούς της GP έχει ελλειψοειδές σχήμα, με διαστάσεις 60x60x55 Å (Εικόνα 33). Η GP είναι μια α/β πρωτεΐνη και αποτελείται από α-έλικες (52%), β-ελάσματα (20%), δυο έλικες 310 μήκους 6 και 12 αμινοξέων αντίστοιχα, και μια π έλικα μήκους 8 αμινοξέων. Οι έλικες ποικίλουν σε μήκος από 7 ως 32 αμινοξέα. Υπάρχει μια περιοχή 95 αμινοξέων (153-247) που αποτελείται μόνο από β-ελάσματα και μια άλλη 112 αμινοξέων (714-825) που αποτελείται μόνο από α-έλικες. Η αναδίπλωση των αμινοξέων γίνεται κατά τέτοιο τρόπο ώστε το μόριο να παρουσιάζει μια συμπαγή δομή ακτίνας 30 Å. Υπάρχουν μικρές περιοχές που προεξέχουν, καθώς και κανάλια που επιτρέπουν τη διέλευση των διαφόρων υποστρωμάτων και μικρών μορίων και βοηθούν στην επικοινωνία μεταξύ των διαφόρων κέντρων σύνδεσης. Τέτοιες περιοχές σχηματίζονται από τα αμινοξέα 36-45 και 260-276, γνωστές ως επικάλυμμα (cap) και πύργος (tower) αντίστοιχα, όπως επίσης και ο βρόχος 280 (αμινοξέα 280-292) και το N-τελικό άκρο (αμινοξέα 1-18) [Oikonomakos N.G. et al., 1992].



**Εικόνα 32: Σχηματικό διάγραμμα του μονομερούς της GP.** Οι περιοχές της πολυπεπτιδικής αλυσίδας που αντιστοιχούν στην  $\alpha 1$  έλικα, στην περιοχή επικαλύμματος, στην αρχή της  $\alpha 2$  έλικας και στην έλικα της περιοχής πύργος, ο βρόχος 280s και η αρχή της  $\alpha 8$  έλικας μαζί με τον βρόχο που συνδέει τις διαμορφώσεις  $\beta 7$  και  $\beta 8$  είναι καθοριστικής σημασίας για τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των υπομονάδων. Το απαραίτητο συνένζυμο PLP είναι εγκλωβισμένο στο κέντρο της υπομονάδας, συνδεδεμένο με τη Lys680 της  $\alpha 21$  έλικας. Το καταλυτικό κέντρο, που φαίνεται στο σχήμα μαζί με την G1P, βρίσκεται κοντά στο συνένζυμο και ο περιβάλλον διαλύτης έχει πρόσβαση σ' αυτό μέσω ενός καναλιού μήκους περίπου 15 Å. Το αλλοστερικό κέντρο, που είναι συνδεδεμένο με το AMP, εντοπίζεται στη διεπιφάνεια μεταξύ των δυο υπομονάδων, μεταξύ της  $\alpha 2$  και της  $\alpha 8$  έλικας. Το κέντρο αποθήκευσης του γλυκογόνου, με πέντε μόρια σακχάρου συνδεδεμένα, συνδέεται με την  $\alpha 12$  έλικα και είναι στην επιφάνεια του ενζύμου μακριά από το καταλυτικό και το αλλοστερικό κέντρο. Το κέντρο του νουκλεοζιτικού αναστολέα βρίσκεται στην είσοδο του καναλιού του καταλυτικού κέντρου. Οι πουρίνες και τα νουκλεοτίδια που συνδέονται σε αυτό το κέντρο δημιουργούν αλληλεπιδράσεις με τη Phe285 από το βρόχο 280s και με την Tyr613 στην αρχή της  $\alpha 19$  έλικας. Η κατάληψη αυτού του κέντρου σταθεροποιεί την T διαμόρφωση και αναστέλλει την δράση του ενζύμου.

Η πολυπεπτιδική αλυσίδα μπορεί να χωριστεί σε δυο αυτοτελείς περιοχές, την 1 και την 2. Η περιοχή 1, που ονομάζεται και ρυθμιστική, αποτελείται από τα αμινοξέα 10-484. Στην περιοχή αυτή βρίσκεται το κέντρο φωσφορυλίωσης της Ser14, το αλλοστερικό κέντρο σύνδεσης του AMP, το αποθηκευτικό κέντρο, οι περιοχές πύργος και επικάλυμμα καθώς και ένα τμήμα του καταλυτικού κέντρου. Η περιοχή 2, που ονομάζεται και καταλυτική, αποτελείται από τα αμινοξέα 485-842. Στην περιοχή αυτή βρίσκεται το κέντρο αναστολής, η PLP και το υπόλοιπο τμήμα του καταλυτικού κέντρου. Η σύνδεση διαφόρων τροποποιητών και υποστρωμάτων οδηγεί στην εμφάνιση συνεργιστικής δράσης (θετικής ή αρνητικής) μεταξύ των κέντρων σύνδεσης, όχι μόνο στην ίδια υπομονάδα αλλά και μεταξύ διαφορετικών υπομονάδων [Fletterick & Madsen, 1980].

### **3.4 ΚΕΝΤΡΑ ΣΥΝΔΕΣΗΣ ΤΗΣ GP:**

Η GP περιέχει τουλάχιστον πέντε πιθανές ρυθμιστικές θέσεις: το κέντρο φωσφορυλίωσης στη Ser14, το αλλοστερικό κέντρο, το καταλυτικό κέντρο που δεσμεύει γλυκογόνο και G1P, το κέντρο σύνδεσης ολιγοσακχαριτών ή κέντρο αποθήκευσης γλυκογόνου, και το κέντρο αναστολής ή νουκλεοζιτικό κέντρο [Oikonomakos N.G .et al., 2000].

#### **3.4.1 Το κέντρο φωσφορυλίωσης της Ser14:**

Το κέντρο φωσφορυλίωσης υπεύθυνο για την ομοιοπολική μετατροπή της GP από τη μορφή b στη μορφή a είναι η σερίνη 14, η οποία έχει στρατηγική θέση στην διεπιφάνεια μεταξύ των υπομονάδων. Η φωσφορυλίωση της σερίνης αυτής, οδηγεί σε αλλαγή της στερεοδιάταξης των τελευταίων 19 αμινοξέων στο C-τελικό άκρο. Στην GPb, τα αμινοξέα αυτά είναι πολύ ευκίνητα και δεν έχουν καθορισμένη δομή, ενώ στην GPa έχουν ορισμένη στερεοδιάταξη και αλληλεπιδρούν με άλλα αμινοξέα και των δύο υπομονάδων [Stryer L. et al., 2012].

### 3.4.2 Το αλλοστερικό κέντρο:

Το αλλοστερικό κέντρο εντοπίζεται στη διεπιφάνεια μεταξύ των υπομονάδων, 32 Å περίπου από το καταλυτικό κέντρο και 12 Å περίπου από τη Ser14. Η τρισδιάστατη δομή του συγκεκριμένου κέντρου έχει αναλυθεί και στις δυο διαμορφώσεις, T και R, της GPa και της GPb. Οι κρυσταλλογραφικές μελέτες έδειξαν ότι το κέντρο αυτό αποτελείται από τρία υποκέντρα, τα οποία είναι τα εξής:

- Υποκέντρο σύνδεσης της φωσφορικής ομάδας
- Υποκέντρο σύνδεσης σακχάρων (ριβόζης)
- Υποκέντρο σύνδεσης των νουκλεοτιδικών βάσεων (πουρίνης)

Οι ενώσεις που συνδέονται στο αλλοστερικό κέντρο είτε ενεργοποιούν (AMP, IMP, G1P, Pi,  $\text{SO}_4^{2-}$ ), είτε αναστέλλουν (ATP, ADP, G6P, UDP-Glc, NADH, β-γλυκεροφωσφορικό ιόν) τη δράση του ενζύμου. Ο αλλοστερικός ενεργοποιητής AMP όταν συνδέεται εντοπίζεται ανάμεσα στις έλικες α2 και α8 και είναι κοντά στη διεπιφάνεια μεταξύ των υπομονάδων [Οϊκονομακος N.G. et al., 1992].

### 3.4.3 Το καταλυτικό κέντρο:

Το καταλυτικό κέντρο ταυτοποιήθηκε κρυσταλλογραφικά από τη σύνδεση των υποστρωμάτων (G1P, Pi) και αναλόγων τους (UDP-Glc). Εμφανίζεται ως μια βαθιά σχισμή μεταξύ των αυτοτελών περιοχών στο κέντρο του μορίου σε απόσταση 15 Å από τη επιφάνεια περίπου. Πολύ κοντά στο καταλυτικό κέντρο βρίσκεται ο συμπαράγοντας PLP. Στην T διαμόρφωση δεν υπάρχει άμεση πρόσβαση προς το καταλυτικό κέντρο από τον περιβάλλοντα διαλύτη. Η πρόσβαση μπορεί να επιτευχθεί μόνο μέσω ενός στενού καναλιού πλάτους 5 Å, αλλά περιορίζεται κυρίως από τον βρόχο αμινοξικής ακολουθίας 282-285. Κατά την αλλοστερική μετάπτωση T σε R, ο βρόχος 282-285 (βρόχος 280s) εκτοπίζεται επιτρέποντας τη δίοδο του υποστρώματος, ενώ η αντικατάσταση της όξινης πλευρικής αλυσίδας του Asp283 από την βασική πλευρική αλυσίδα της Arg569 συμβάλλει στη δημιουργία ενός κέντρου αναγνώρισης των Pi υψηλής

συγγένειας [Johnson L.N., 1992] [Oikonomakos N.G., 2000] [Oikonomakos N.G., 2001] [Oikonomakos N.G. et al., 2002].

#### **3.4.4 Το κέντρο σύνδεσης ολιγοσακχαριτών:**

Το αποθηκευτικό κέντρο εντοπίζεται στην επιφάνεια της πρωτεΐνης, περίπου 30 Å από το καταλυτικό κέντρο και 40 Å από το αλλοστερικό κέντρο. Μέσω της συγκεκριμένης περιοχής η GP συνδέεται με τα σωματίδια του γλυκογόνου *in vivo*. Η περιοχή αυτή βρίσκεται σε ένα αβαθές αυλάκι που σχηματίζεται από δυο αντιπαράλληλες α-έλικες και φιλοξενεί ολιγοσακχαρίτες που έχουν διαμόρφωση αριστερόστροφης έλικας [Johnson et al., 1989]. Το αποθηκευτικό κέντρο λειτουργεί ως ένα επιπρόσθετο κέντρο ρύθμισης, όπου η κατάληψή του από τον ολιγοσακχαρίτη οδηγεί σε αύξηση του ρυθμού κατάλυσης [Oikonomakos N.G., 2001].

#### **3.4.5 Το κέντρο αναστολής:**

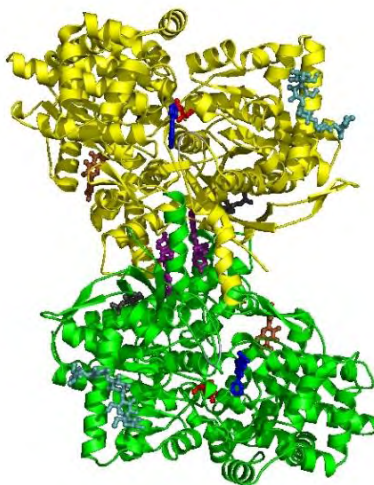
Το κέντρο αναστολής (νουκλεοζιτικό κέντρο) είναι ένα υδροφοβικό κέντρο σύνδεσης που εντοπίζεται πολύ κοντά στην επιφάνεια του ενζύμου και σε απόσταση 12 Å περίπου από την είσοδο του καταλυτικού κέντρου. Το κέντρο αναστολής περιλαμβάνει ένα μέρος της περιοχής 1 (αμινοξέα 13-484) καθώς επίσης και ολόκληρη την περιοχή 2 (αμινοξέα 485-842). Στην T διαμόρφωση του ενζύμου, το κέντρο αναστολής φράσσει την είσοδο του καναλιού που οδηγεί στο καταλυτικό κέντρο. Έχει αποδειχτεί πως οι πουρίνες (όπως η αδερίνη και η καφεΐνη), τα νουκλεοσίδια (όπως η αδενοσίνη και η ινωσησίνη), τα νουκλεοτίδια (όπως το AMP, το IMP και το ATP), το NADH καθώς επίσης και συγκεκριμένα ετεροκυκλικά σώματα (όπως η ριβοφλαβίνη) δένονται στο κέντρο αναστολής της μυϊκής GP<sub>a</sub> και GP<sub>b</sub>, όχι όμως και στην ηπατική GP<sub>a</sub>, η οποία παρουσιάζει συγκεκριμένη εκλεκτικότητα [Johnson L.N., 1992] [Oikonomakos N.G., 2000a] [Oikonomakos et al., 2002].

Στην T διαμόρφωση της GP, η Phe285 του βρόχου 280s εντοπίζεται κοντά στην Tyr613 στην αρχή της α19 έλικας (αμινοξέα 613-631) και μαζί, αυτά τα δυο υδροφοβικά μόρια, συνεργικά, σχηματίζουν το κέντρο αναστολής. Η κατάληψη αυτού του κέντρου από ένα μόριο έχει σαν αποτέλεσμα την σταθεροποίηση της T διαμόρφωσης του ενζύμου καθώς επίσης και τη φραγή της εισόδου του καταλυτικού κέντρου. Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται η αναστολή της δράσης της GP [Johnson L.N., 1992] [Oikonomakos N.G. et al., 2002]. Η σύνδεση των

αναστολέων με την πρωτεΐνη δεν πραγματοποιείται με δεσμούς ηλεκτροστατικής φύσης, καθώς δεν έχουν παρατηρηθεί δεσμοί υδρογόνου με τα αμινοξέα του ενζύμου. Θερμοδυναμικές μελέτες έχουν δείξει ότι η κύρια πηγή για την ενέργεια σύνδεσης προέρχεται από την παράλληλη επιστοίβαξη των δακτυλίων των αρωματικών αμινοξέων [Sprang et al., 1982].

### 3.4.6 Το νέο αλλοστερικό κέντρο:

Το νέο αλλοστερικό κέντρο εντοπίζεται στην διεπιφάνεια των δυο υπομονάδων στην περιοχή της κεντρικής κοιλότητας της διμερούς δομής της GPb. Σε αυτό συνδέεται η ένωση ινδिरουβίνη-ανάλογο-ινδिरουβίνη-3-αμινοξυ-οξική (E243), το CP320626, η ένωση ινδολο-2-καρβοξαμίδιο, καθώς επίσης και η βενζόυλο-N-β-D-γλυκοκυρανοζυλουρία (Bzurea), δημιουργώντας αξιοσημείωτες αλληλεπιδράσεις με την T διαμόρφωση της GPb. Αντιθέτως, οι αλληλεπιδράσεις αυτές μειώνονται κατά πολύ κατά τη σύνδεση της συγκεκριμένης ένωσης στην R διαμόρφωση της GPa [Oikonomakos NG et al., 2002] [Kosmopoulou MM, 2005]. Από την άλλη πλευρά, το μόριο της **Quercetin** δεσμεύεται σε διαφορετική θέση από το AMP, σε μια τοποθεσία κοντά στην επιφάνεια της πρωτεΐνης, 15 Å από το ενεργό κέντρο, 43 Å από το αλλοστερικό κέντρο και 32 Å από το κέντρο αναστολής. Η Quercetin σταθεροποιεί την T διαμόρφωση της GPb, ενώ βρέθηκε ότι μπορεί να αναστείλει τη γλυκογονόλυση στα ηπατοκύτταρα (Εικόνα 33) [Kantsadi A.L. et al., 2014].



**Εικόνα 33: Σχηματικό διάγραμμα του μονομερούς της GP με το νέο κέντρο σύνδεσης – Quercetin (πορτοκαλί) [Kantsadi A.L. et al., 2014].**

### 3.5 Η ΦΩΣΦΟΡΥΛΑΣΗ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ ΩΣ ΣΤΟΧΟΣ ΥΠΟΓΛΥΚΑΙΜΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ:

Η αναστολή της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (GP) έχει προταθεί ως μια θεραπευτική στρατηγική για τη θεραπεία του διαβήτη τύπου 2 ενώ βιολογικές μελέτες επιβεβαιώνουν ότι αποτελεί μοριακό στόχο για την ανάπτυξη νέων υπογλυκαιμικών φαρμάκων [Oikonomakos N.G., 2001] [McCormack et al., 2001] [Aiston et al., 2003]. Η φωσφορυλάση είναι ένας ισχυρός υποψήφιος στόχος για τον έλεγχο της υπεργλυκαιμίας στο ΣΔτ2, τόσο στην απορροφητική όσο και στη μετααπορροφητική κατάσταση [Aiston et al. 2001]. Υπάρχει μια συνεχής έρευνα για ενώσεις που μπορούν να επιτύχουν τη ρύθμιση της παραγωγής γλυκόζης από το ήπαρ ώστε να βελτιώσουν αυτή τη θεραπεία. Οι προσπάθειες για την ανακάλυψη νέων υπογλυκαιμικών σκευασμάτων έχουν ως στόχο την αναστολή της ανθρώπινης ηπατικής φωσφορυλάσης (HLGP), καθώς αυτή είναι ένα ένζυμο κλειδί στον ανθρώπινο μεταβολισμό, λόγω του κεντρικού ρόλου της στον μεταβολισμό του γλυκογόνου, την αποθήκευση και την απελευθέρωση της γλυκόζης. Ακριβώς γι' αυτό το ρόλο που διαδραματίζει στον έλεγχο του μεταβολισμού του γλυκογόνου και τον έλεγχο της παραγωγής γλυκόζης από το ήπαρ, η HLGP αξιοποιείται ως ένα μοντέλο για το σχεδιασμό ισχυρών αναστολέων της GP (GPIs), ως πιθανοί νέοι υπογλυκαιμικοί παράγοντες, οι οποίοι θα μπορούν να εμποδίσουν την ενδογενή ανεπιθύμητη γλυκογονόλυση κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες [Treadway et al., 2001] [Kristiansen M., 2004]. Αρκετές ρυθμιστικές θέσεις πρόσδεσης έχουν ταυτοποιηθεί σε GP, όπως η καταλυτική, η αλλοστερική, και οι θέσεις σύνδεσης αναστολέα. Η μελέτη της αναστολής της GP αποτελεί μια συνεχή πρόκληση για τις επιστήμες της φυσικής, της συνθετικής και φαρμακευτικής χημείας και της πρωτεϊνικής κρυσταλλογραφίας [Oikonomakos N.G., 2002].

Ωστόσο η ύπαρξη των τριών ισομορφών (της ηπατικής, της μυϊκής και του εγκεφάλου) της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, θέτει το ζήτημα της επιλεκτικότητας των φαρμάκων για αναστολή. Συγκεκριμένα για την μείωση των επιπέδων του σακχάρου στο αίμα, οι αναστολείς θα πρέπει να στοχεύουν στο ισοένζυμο του ήπατος χωρίς να επηρεάζουν τις δυο άλλες ισομορφές [Somsak et al., 2008]. Λόγω της ομολογίας των τριών ισομορφών της GP, μπορεί να μην είναι δυνατή η ακριβής στόχευση μόνο της ηπατικής ισομορφής. Παρόλα αυτά, επειδή το ήπαρ είναι το κύριο όργανο έκθεσης σε φάρμακα τα οποία λαμβάνονται δια στόματος, θα πρέπει να είναι δυνατόν να επιτευχθεί η κατάλληλη δόση φαρμάκου που θα στοχεύει κυρίως στο ήπαρ [Oikonomakos N.G. et al., 2008].

Ισχυροί αναστολείς του ενζύμου GP είναι πιθανό να έχουν κλινικό ενδιαφέρον στη θεραπεία του διαβήτη. Η τρισδιάστατη δομή της T διαμόρφωσης

της μυϊκής GPb από κουνέλια (η οποία έχει διαπιστωθεί ότι διαθέτει 80% ομολογία στην ακολουθία των αμινοξέων με την ανθρώπινη ηπατική GP [Rath V.L., et al., 1987]) που μελετήθηκε με ακτίνες X, έχει προσδιορισθεί σε υψηλή ευκρίνεια. Το σύμπλοκο του ενζύμου σε αυτή τη διαμόρφωση με γλυκόζη (που αποτελεί ένα φυσιολογικό ρυθμιστή), έχει επίσης προσδιορισθεί. Η δομή του παραπάνω συμπλόκου έχει χρησιμοποιηθεί ως πρότυπο για τη σύνθεση παραγώγων γλυκόζης υποκατεστημένων στη θέση του πρώτου άνθρακα (C-1). Έτσι, έχει συντεθεί ένας αριθμός τέτοιων ενώσεων για τις οποίες αναμένονταν να καταλαμβάνουν διαμορφώσεις με χαμηλή ενέργεια σύνδεσης και στη συνέχεια εξετάστηκαν ως προς την ικανότητά τους να αναστέλλουν τη GP. Έχουν πραγματοποιηθεί επίσης αναλύσεις με ακτίνες X για να διαπιστωθεί κατά πόσο οι ενώσεις αυτές αλληλεπιδρούν με το καταλυτικό κέντρο του ενζύμου. Οι παρατηρούμενοι τρόποι σύνδεσης των ενώσεων ήταν γενικά κοντά σε αυτούς που είχαν προβλεφθεί, αλλά η συγγένεια σύνδεσης δεν ήταν καλύτερη απ' αυτή που μετρήθηκε για τη γλυκόζη. Ωστόσο, τα αποτελέσματα παρείχαν κατευθυντήριες γραμμές για το σχεδιασμό περισσότερου ισχυρών αναστολέων [Blundell et al., 2002].

Η διατήρηση των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα είναι ζωτικής σημασίας για την ελαχιστοποίηση των επιπτώσεων του διαβήτη, καθιστώντας την ηπατική φωσφορυλάση δυνητικό θεραπευτικό στόχο. Μια νέα θέση πρόσδεσης στην ανθρώπινη ηπατική φωσφορυλάση του γλυκογόνου (HLGP) για την κατηγορία των πολλά υποσχόμενων αντιδιαβητικών παραγόντων, εντοπίστηκε κρυσταλλογραφικώς, το σύμπλοκο CP-403,700, και λειτουργεί αλλοστερικά σταθεροποιώντας την ανενεργό διαμόρφωση της HLGP. Η κρυσταλλική δομή αποκάλυψε τις λεπτομέρειες του αναστολέα δέσμευσης, και οδήγησε στο σχεδιασμό μιας νέας κατηγορίας ενώσεων. Θα πρέπει όμως να επιταχυνθούν οι προσπάθειες για την ανάπτυξη θεραπευτικά σχετικών μορίων για τη θεραπεία του διαβήτη. [Rath V.L., 2000].

Απώτερος στόχος της έρευνας που διεξάγεται είναι η εύρεση ενός αναστολέα, ο οποίος θα μιμείται την δράση της γλυκόζης και θα δρα σε πολύ μικρότερες συγκεντρώσεις απ' αυτή (για να είναι αποδεκτός ως φαρμακευτικό προϊόν), χωρίς να προκαλεί πλήρη αδρανοποίηση της GP. Εάν θεωρηθεί ότι η δόση για ένα μέσο ενήλικα είναι 300 mg, τότε απαιτείται ένας αναστολέας με  $K_i \approx 1 \mu\text{M}$ , ώστε να μπορεί να μιμηθεί τη δράση 30-50 mM γλυκόζης στη ρύθμιση του μεταβολισμού του γλυκογόνου. Ο υπολογισμός υποθέτει πως το σύνολο του φαρμάκου φτάνει στο στόχο του. Αν όμως ληφθεί υπ' όψη η απορρόφηση και η βιοδιαθεσιμότητα του φαρμάκου τότε απαιτείται αναστολέας με  $K_i \approx 0.1 \mu\text{M}$  [Witters & Avruch, 1978].



Η εύρεση ενός κατάλληλου αναστολέα έχει απώτερο σκοπό την ενσωμάτωσή του σε «βιολειτουργικά τρόφιμα» τα οποία θα διατίθενται ως θεραπεία σε διαβητικούς ασθενείς. Ο όρος «βιολειτουργικά τρόφιμα» χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά στην Ιαπωνία για να περιγράψει τρόφιμα που έχουν ορισμένα πλεονεκτήματα για την υγεία του ανθρώπου. Ως «βιολειτουργικά» ορίζονται τα επεξεργασμένα τρόφιμα που περιέχουν υλικά/ συστατικά τα οποία, εκτός από τη θρεπτική αξία που παρέχουν, επηρεάζουν θετικά ειδικές λειτουργίες του ανθρώπινου οργανισμού, ή αλλιώς εκείνα που προάγουν την υγεία, και παρασκευάζονται με προσθήκη συστατικών που τα ίδια τα τρόφιμα δεν περιέχουν ή με ενίσχυση των ήδη υπαρχόντων. Με άλλα λόγια «βιολειτουργικά» είναι τρόφιμα ή συστατικά τροφίμων που διαθέτουν προληπτικά ή/και προαγωγικά (ενισχυτικά) πλεονεκτήματα εκτός από τη θρεπτική τους αξία. Στην Ευρώπη «βιολειτουργικά τρόφιμα» ορίζονται εκείνα τα οποία περιέχουν συστατικά που προσδίδουν ορισμένα πλεονεκτήματα, πέρα από τη θρεπτική αξία, και επομένως βελτιώνουν τη λειτουργία του οργανισμού. Οφείλουν να διακρίνονται από τις βιταμίνες, τα μέταλλα και άλλα διαιτητικά πρόσθετα [No-Seong Kwak & Jukes D.J., 1999] [Goldberg I., 1999] [Diplock A.T., 1999].

Τα «βιολειτουργικά τρόφιμα» δεν είναι χάπια ή σκόνες, αλλά περιέχουν ή εμπλουτίζονται με συστατικά που προέρχονται από φυσικά υλικά ή που έχουν τροποποιηθεί με βιοτεχνολογικά μέσα. Κάποια τέτοια τρόφιμα μπορεί να αποτελέσουν μέρος της καθημερινής διατροφής έχοντας επίδραση σε ειδικές λειτουργίες του οργανισμού, όπως για παράδειγμα την αναστολή της δραστηριότητας της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου ώστε να επιτυγχάνεται μείωση της ηπατικής παραγωγής της γλυκόζης. Η θετική τους επίδραση στον οργανισμό οφείλεται σε βιολογικά ενεργά συστατικά, τα «τροφοθεραπευτικά» (nutraceuticals), τα οποία έχουν πλεονεκτήματα για τη θεραπεία ασθενειών όπως ο Σακχαρώδης Διαβήτης. Η λειτουργικότητα πολλών συστατικών των τροφίμων έχει επαληθευτεί από κλινικές και επιδημιολογικές έρευνες και η επίδραση ορισμένων συστατικών στην υγεία έχει ήδη αποδειχθεί από ερευνητικές μελέτες. Ορισμένα από τα κλασικά τροφοθεραπευτικά συστατικά είναι: τα αντιοξειδωτικά, τα προβιοτικά, τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (λινελαϊκό και α-λινολενικό), τα τερπενοειδή (φυτοστερόλες), και τα φλαβονοειδή [No-Seong Kwak & Jukes D.J., 1999].

Στην Ευρώπη η νομοθετική κατάσταση για τα βιολειτουργικά τρόφιμα είναι ακόμα ασαφής και δεν υφίσταται καμιά νομοθεσία όσον αφορά την επισήμανση των προϊόντων ως προς την επίδραση τους στην υγεία. Η Ολλανδία, η Σουηδία και η Μ. Βρετανία προσπαθούν να αναπτύξουν νομοθεσία για τα βιολειτουργικά τρόφιμα, ενώ πολλές χώρες αναγνωρίζουν αυτή τη νέα κατηγορία προϊόντων. Όσο ο διαχωρισμός μεταξύ τροφίμων και φαρμάκων δεν είναι ακριβής, τόσο η

νομοθεσία γίνεται πιο περίπλοκη. Τα φάρμακα παράγονται για συγκεκριμένες ασθένειες και αποσκοπούν στη θεραπεία τους, υπάγονται δε σε ιατρικούς ελέγχους των σχετικών χωρών. Τα βιολειτουργικά τρόφιμα δεν απαιτείται να έχουν θεραπευτική δράση, αλλά να ενισχύουν τη λειτουργία του οργανισμού. Η νομοθεσία για τα βιολειτουργικά τρόφιμα αναφέρεται σε ισχυρισμούς όπως για παράδειγμα στο ότι η υγεία συνδέεται με την κατανάλωση των συγκεκριμένων προϊόντων. Τα βιολειτουργικά τρόφιμα διακρίνονται από τα φάρμακα και από τον χρόνο δράσης τους, δηλαδή αποσκοπούν σε μακροπρόθεσμη επίδραση στην υγεία σε αντίθεση με τα φάρμακα που οφείλουν να έχουν άμεση επίδραση. Τέλος, η σταθερότητα των θρεπτικών συστατικών και η απορρόφησή τους από τα εμπλουτισμένα αυτά τρόφιμα πρέπει να αποδεικνύεται [Diplock A.T., 1999].

### **3.6 ΦΥΤΙΚΑ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ ΩΣ ΕΝ ΔΥΝΑΜΕΙ ΑΝΤΙΔΙΑΒΗΤΙΚΑ ΣΚΕΥΑΣΜΑΤΑ:**

Τα εκχυλίσματα από ρόδι έχουν μελετηθεί στο παρελθόν ως προς τις ευεργετικές τους δράσεις στην ανθρώπινη υγεία [Matthaiou et al., 2014]. Στην παρούσα εργασία ασχοληθήκαμε με τις πιθανές ευεργετικές ιδιότητες προϊόντων και παραπροϊόντων ροδιού στην αντιμετώπιση του Σακχαρώδους Διαβήτη τύπου 2.

#### **3.6.1 Εκχυλίσματα ροδιού:**

Η Ροδιά παρουσιάζεται ως το παλαιότερο, καλλιεργημένο καρποφόρο δέντρο από το 3000 π.χ. και οι καρποί της χρησιμοποιούνταν για τις θεραπευτικές ιδιότητες που διαθέτουν. Από την αρχαιότητα, το ρόδι είχε μια ιδιαίτερη θέση στις αντιλήψεις, στη διατροφή και αντιμετώπιση των ασθενειών. Αναφέρεται ως σύμβολο της καλοτυχίας, της ευημερίας, της αφθονίας, και της γονιμότητας. Η ονομασία ρόδι προέρχεται από τη βοτανική ονομασία *Punica Granatum* που μεταφράζεται ως «Μήλο με πολλούς καρπούς – σπόρια».

Η ροδιά πρωτοεμφανίστηκε στην περιοχή μεταξύ του Ιράν και της βόρειας Ινδίας και καλλιεργήθηκε μέσα στους αιώνες, από την αρχαιότητα μέχρι σήμερα, σε όλη τη λεκάνη της Μεσογείου [Morton J.F., 1987]. Το φυτό είναι ένας φυλλοβόλος θάμνος και ανήκει στην οικογένεια *Punicaceae*. Η πιο εμπορική ποικιλία στην Ελλάδα είναι η Wonderful η οποία προέρχεται από τη Φλόριντα των Η.Π.Α. Τα τελευταία χρόνια, αν και δεν υπάρχουν ακριβή στατιστικά στοιχεία

φαίνεται ότι οι καλλιεργούμενες εκτάσεις ροδιάς έχουν αυξηθεί σημαντικά [Pradeepkumar et al., 2008]. Το ρόδι είναι ένα εξαιρετικά οφέλιμο φρούτο, από τα λίγα που καταναλώνονται μαζί με το κουκούτσι δίνοντας τη δυνατότητα της πλήρους οφέλειας από την θρεπτική του αξία. Σύμφωνα με κλινικές και επιστημονικές μελέτες, έχει αποδειχτεί ότι η κατανάλωση ροδιού έχει σημαντική ευεργετική επίδραση στον ανθρώπινο οργανισμό [Viuda-Martos M. et al., 2010]. Το υψηλό επίπεδο των αντιοξειδωτικών στο ρόδι, και ιδιαίτερα ανθοκυανινών, τανινών και πολυφαινολών, προστατεύουν το οργανισμό μας από τις ελεύθερες ρίζες αποτρέποντας την ανάπτυξη καρκινικών όγκων, ενώ έχει φανεί πως προστατεύουν και από την οξειδωση της LDL και από τη δημιουργία αθηρωμάτωσης των αρτηριών και κατ' επέκταση από καρδιαγγειακά νοσήματα [Lansky E.P. & Newman R.A., 2007] [Fuhrman B. et al., 2010] [Elfalleh W. et al., 2011]. Έρευνες έχουν αποδείξει ότι η περιεκτικότητα του χυμού του ροδιού σε αντιοξειδωτικά είναι τρεις φορές υψηλότερη από το πράσινο τσάι και το κόκκινο κρασί. Ο μη βρώσιμος φλοιός του ροδιού περιέχει τουλάχιστον τρεις φορές το συνολικό ποσό των πολυφαινολών που περιέχονται στους καρπούς του [Schubert S.Y. et al., 1999] [Singh R.P., 2002]. Σημαντική φαίνεται να είναι και η δράση του στην μείωση της συστολική πίεσης αναστέλλοντας την αγγειοτενσίνη, κι έχοντας χαμηλή περιεκτικότητα σε νάτριο, ενώ το κάλιο είναι το πρώτο σε περιεκτικότητα μέταλλο του ενδοκυττάριου χώρου [Aviram M. & Dornfeld L., 2001] [Aviram M. et al., 2004]. Το ρόδι επίσης περιλαμβάνει μεγάλες ποσότητες βιταμινών A, C και E, έχει μεγάλη περιεκτικότητα σε φυτικές ίνες καθώς και καλές ποσότητες μη αιμικού σιδήρου αλλά έχει και αντιδιαβητική, αντιϊκή και αντιμυκοτοκτόνο δράση. Ακόμη, έχει παρατηρηθεί πως ο χυμός του ροδιού καθώς και τα έλαια των σπόρων έχουν αντιμικροβιακές δράσεις και βοηθούν στην καταπολέμηση φλεγμονών. Τελευταία υπάρχουν ισχυρισμοί και για περαιτέρω οφέλιμες ιδιότητες του ροδιού, όπως η προστασία του δέρματος, ενώ έχει παρατηρηθεί πως ο χυμός του ροδιού καθώς και τα έλαια των σπόρων έχουν αντιμικροβιακές δράσεις και βοηθούν στην καταπολέμηση φλεγμονών [Lee C.J. et al., 2010].

Στη παρούσα διατριβή, μελετήθηκε η ανασταλτική δράση ως προς τη GPb εκχυλισμάτων παραπροϊόντων επεξεργασίας ροδιού από τις παρακάτω ποικιλίες:

- **ΞΙΝΗ** (κωδικός **Ξ3**, ολόκληρος καρπός, συγκομιδή 2012)
- **ΠΛΟΥΤΟ** (κωδικός **ΠΛ**, βρώσιμο μέρος καρπού, συγκομιδή 2013)
- **ΠΕΡΣΕΦΟΝΗ** (κωδικός **ΠΕ**, βρώσιμο μέρος καρπού, συγκομιδή 2013)

**4° ΜΕΡΟΣ**

**ΚΙΝΗΤΙΚΗ**

**ΕΝΖΥΜΙΚΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΩΝ**

## 4.1 ΑΡΧΕΣ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΚΙΝΗΤΙΚΗΣ:

Τα ένζυμα είναι πρωτεΐνες που δρουν ως βιολογικοί καταλύτες επειδή έχουν την ικανότητα να προάγουν ειδικές χημικές αντιδράσεις κάτω από τις ήπιες συνθήκες που επικρατούν στους περισσότερους ζωντανούς οργανισμούς. Τα ένζυμα δεν αλλάζουν τη θέση της ισορροπίας σε μια αντιστρεπτή αντίδραση, αλλά επιταχύνουν την επίτευξή της χαμηλώνοντας την ενέργεια ενεργοποίησης, που απαιτείται κατά την μετατροπή υποστρώματος σε προϊόν, με το να διευκολύνουν τη δημιουργία της μεταβατικής κατάστασης. Τα ένζυμα έχουν τρία διακριτικά χαρακτηριστικά: Υψηλή εξειδίκευση, υψηλή ταχύτητα αντίδρασης και μεγάλη ικανότητας ρύθμισης.

Όλα τα ένζυμα συνδέουν αντιστρεπτά το υπόστρωμά τους σε μια ειδική περιοχή δέσμευσης γνωστής ως το ενεργό κέντρο, που δημιουργείται από την τρισδιάστατη δομή του πρωτεϊνικού μορίου. Το σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος (ES), υφίσταται μια καταλυτική αντίδραση, που προάγεται από ειδικά κατάλοιπα αμινοξέων στο ενεργό κέντρο, η οποία οδηγεί στο σχηματισμό του προϊόντος (P). Οι καταλυτικές ιδιότητες ενός ενζύμου συχνά εξαρτώνται από την ύπαρξη μη-πεπτιδικών μορίων, γνωστών ως συμπαραγοντες ή συνένζυμα, τα οποία συνδέονται με το ένζυμο και προάγουν την αντίδραση. Ορισμένα ένζυμα (αλλοστερικά) μπορεί να περιέχουν, εκτός από το ενεργό κέντρο, ξέχωρες ρυθμιστικές ή αλλοστερικές περιοχές για την σύνδεση άλλων μορίων, τα οποία, όταν συνδεθούν, τροποποιούν την καταλυτική δράση του ενζύμου επειδή επάγουν αλλαγές στη διαμόρφωση του ενεργού κέντρου. Αυτά τα ρυθμιστικά μόρια ονομάζονται τροποποιητές και μπορεί να ενεργοποιούν ή να καταστέλλουν το ένζυμο [Γεωργάτσος, 2005].

Το 1913, ο Leonor Michaelis και η Maud Menten πρότειναν ένα μοντέλο, το μοντέλο Michaelis – Menten, το οποίο εξηγεί τα κινητικά χαρακτηριστικά πολλών ενζύμων. Η κινητική των ενζυμικών αντιδράσεων, σύμφωνα με το μοντέλο αυτό, ασχολείται με την μέτρηση των δύο χαρακτηριστικών σταθερών του κάθε ενζύμου,  $V_{\max}$  και  $K_M$ , και με την μελέτη των παραγόντων που επηρεάζουν την ενζυμική αντίδραση. Οι κυριότεροι από τους παράγοντες αυτούς είναι η συγκέντρωση του ενζύμου, η συγκέντρωση του υποστρώματος και άλλων ουσιών που μπορούν να συνδεθούν με το ένζυμο (προϊόντα αντιδράσεως, συνένζυμα, ενεργοποιητές, αναστολείς), το pH, η θερμοκρασία και η ιοντική ισχύς [Stryer L. et al., 2012].

Η ενεργότητα ενός ενζύμου, εκφράζεται με την ταχύτητα της αντίδρασης που καταλύεται από το ένζυμο. Για την απλούστερη περίπτωση, όπου ένα υπόστρωμα μετατρέπεται μη αντιστρεπτά σε ένα προϊόν, στην αντίδραση:



(όπου  $k_1$ ,  $k_2$  και  $k_{-1}$  οι κινητικές σταθερές της ταχύτητας των επιμέρους αντιδράσεων, E το ένζυμο, S το υπόστρωμα, ES το σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος, και P το προϊόν)

Η ταχύτητα (V) ορίζεται σαν το ποσό του υποστρώματος (S) που καταναλώνεται ή το ποσό των προϊόντων (P) που δημιουργούνται στην μονάδα του χρόνου ( $V = -d[S]/dt = d[P]/dt$ ) και υπολογίζεται από την **εξίσωση Michaelis - Menten**:

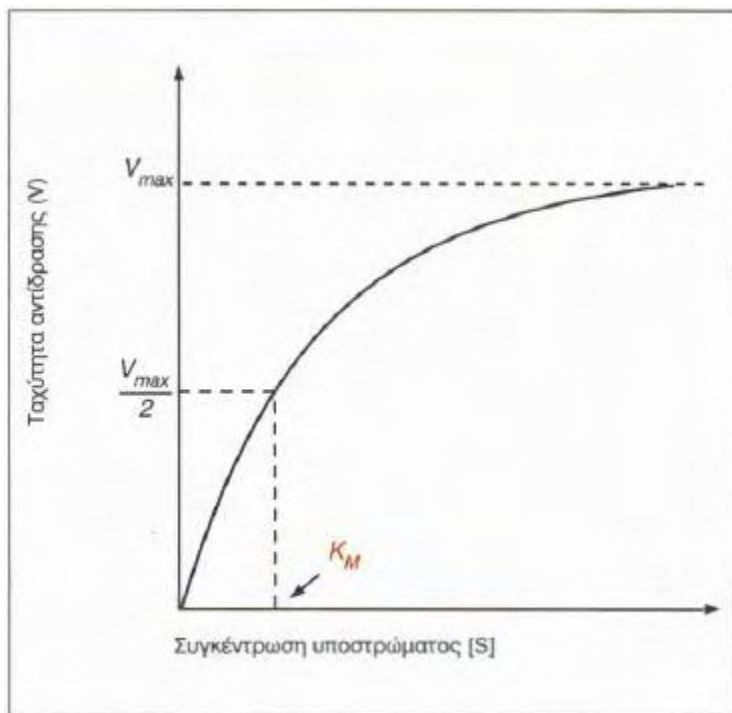
$$V_o = V_{\max} \frac{[S]}{[S] + K_m}$$

Όπου  $V_o$  η αρχική ταχύτητα της αντίδρασης,  $[S]$  η αρχική συγκέντρωση του υποστρώματος,  $V_{\max}$  η μέγιστη ταχύτητα για την συγκέντρωση του ενζύμου που χρησιμοποιήθηκε και  $K_m$  η σταθερά Michaelis :

$$K_m (\text{σταθερά Michaelis}) = (k_2 + k_{-1}) / k_1$$

Από την **εξίσωση Michaelis-Menten** προκύπτει ότι η αρχική ταχύτητα μιας αντίδρασης εξαρτάται από την συγκέντρωση του υποστρώματος. Για πολλές ενζυμικές αντιδράσεις, όπου ένα υπόστρωμα μετατρέπεται σε ένα προϊόν, το διάγραμμα μεταβολής της αρχικής ταχύτητας αντίδρασης ( $V_o$ ), με τη συγκέντρωση του υποστρώματος  $[S]$ , είναι μια ορθογώνια υπερβολή (Εικόνα 34). Παρατηρούμε ότι σε χαμηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος η αρχική ταχύτητα αυξάνει γραμμικά με τη συγκέντρωση του υποστρώματος (κινητική πρώτης τάξεως,  $V_o = k[S]$ ), ενώ σε υψηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος η αρχική ταχύτητα γίνεται σταθερή και ανεξάρτητη από την συγκέντρωση του υποστρώματος (κινητική μηδενικής τάξεως ή κινητική κορεσμού,  $V_o = k$ ) και πλησιάζει την οριακή τιμή της μέγιστης ταχύτητας,  $V_{\max}$ . Η **σταθερά Michaelis ( $K_m$ )** είναι η συγκέντρωση υποστρώματος στην οποία έχουμε το ήμισυ της

μέγιστης ταχύτητας. Μας δίνεται επομένως μια εκτίμηση της συγγένειας του ενζύμου προς το συγκεκριμένο υπόστρωμα [Stryer L. et al., 2012].



**Εικόνα 34: Κινητική Michaelis-Menten:** Ένα διάγραμμα της ταχύτητας ( $V_o$ ) μιας ενζυμικής αντίδρασης σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του υποστρώματος  $[S]$ , για ένα ένζυμο που υπακούει στην κινητική Michaelis- Menten, δείχνει ότι η μέγιστη ταχύτητα ( $V_{max}$ ) προσεγγίζεται ασυμπτωματικά. Η σταθερά Michaelis ( $K_M$ ) είναι η συγκέντρωση υποστρώματος που παράγει μια ταχύτητα ίση με  $V_{max}/2$  [Stryer L. et al., 2012].

Οι καταλυτικές σταθερές  $K_M$  και  $V_{max}$  είναι χαρακτηριστικές μιας ενζυμικής αντίδρασης. Η τιμή  $K_M$  για ένα ένζυμο εξαρτάται από τη συγκέντρωση του συγκεκριμένου υποστρώματος, καθώς επίσης και από περιβαλλοντικές συνθήκες όπως π.χ. το pH, η θερμοκρασία και η ιοντικής ισχύς. Η  $K_M$  έχει μονάδες συγκέντρωσης και για τα περισσότερα ένζυμα έχει τιμές μεταξύ  $10^{-1}$  και  $10^{-7}$  M. Αντιθέτως, η  $V_{max}$ , η μέγιστη ταχύτητα, αποκαλύπτει τον αριθμό μετατροπής ενός ενζύμου, ο οποίος είναι ο αριθμός των μορίων του υποστρώματος (S) που μετατρέπονται σε προϊόν (P) ανά μονάδα χρόνου από ένα μόριο ενζύμου, όταν το ένζυμο είναι πλήρως κορεσμένο με υπόστρωμα. Εξαρτάται από το ποσό του ενζύμου που χρησιμοποιείται και γι' αυτό εκφράζεται ως ταχύτητα σχηματισμού P ανά μονάδα ενζύμου (πχ  $\mu\text{moles/min/mg}$  πρωτεΐνης) [Stryer L. et al., 2012].

Μια άλλη πολύ χρήσιμη σταθερά είναι ο αριθμός ανακύκλωσης ή  $k_{cat}$ , ο οποίος ορίζεται ως  $k_{cat} = V_{max} / [E]_T$ , όπου  $[E]_T$  είναι η ολική συγκέντρωση του ενζύμου. Η  $k_{cat}$  αντιστοιχεί στον μέγιστο αριθμό moles υποστρώματος που μπορούν να μετατραπούν σε προϊόν ανά mole ενζύμου ανά μονάδα χρόνου σε συνθήκες ενζυμικού κορεσμού, αντιπροσωπεύει δηλαδή τη μοριακή ενεργότητα του ενζύμου και εκφράζεται σε  $sec^{-1}$ . Η  $k_{cat}$  ισούται με την  $k_3$  όταν  $[S] \gg K_M$ . Τέλος, η σταθερά εξειδίκευσης,  $k_{cat}/K_M$ , ο λόγος δυο σταθερών, εκφράζεται σε  $M^{-1}sec^{-1}$  και είναι ενδεικτική της κινητικής αποδοτικότητας του ενζύμου. Αντιστοιχεί στην σταθερά της ταχύτητας  $k_1$  ανάμεσα στο υπόστρωμα και στο ελεύθερο ένζυμο, όταν  $[S] \ll K_M$  [Stryer L. et al., 2012].

## 4.2 ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΕΝΖΥΜΙΚΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΩΝ:

Η ενζυμική ενεργότητα επηρεάζεται από την ύπαρξη αναστολέων. Οι αναστολείς ενζύμων (I) είναι συνδέτες που ενώνονται ειδικά με ένα ένζυμο με ένα τέτοιο τρόπο ώστε να μειώνουν την ικανότητα του να συνδέει το υπόστρωμα και να το μετατρέψει σε προϊόν, παρεμποδίζουν στην ουσία την ενζυμική αντίδραση.

Η ενζυμική αναστολή μπορεί να είναι είτε αντιστρεπτή είτε μη-αντιστρεπτή. Ένας **μη-αντιστρεπτός αναστολέας** διαχωρίζεται πολύ αργά από το ένζυμο-στόχο, διότι συνδέεται πολύ ισχυρά με το ένζυμο, είτε ομοιοπολικά είτε μη ομοιοπολικά. Δεν μπορεί να απομακρυνθεί με ήπια μέσα όπως είναι η διαπίδυση και είτε παρεμποδίζει τη δέσμευση του υποστρώματος, είτε εξουδετερώνει κάποια πλάγια αλυσίδα ενός αμινοξέος που συμμετέχει στην καταλυτική διεργασία. Η αντιστρεπτή αναστολή, σε αντίθεση με τη μη αντιστρεπτή, χαρακτηρίζεται από έναν ταχύ διαχωρισμό του συμπλόκου ενζύμου-αναστολέα. Ένας **αντιστρεπτός αναστολέας** μπορεί να αφαιρεθεί από το περιβάλλον του ενζυμικού συστήματος σχετικά εύκολα (π.χ. με διαπίδυση) και όταν αφαιρεθεί, το ένζυμο επανακτά την δραστηριότητά του. Οι αντιστρεπτοί αναστολείς δεσμεύονται αμφίδρομα και μη ομοιοπολικά με το ένζυμο, έτσι, ώστε να αποκαθίσταται μια κατάσταση ισορροπίας όπως στη σχέση:



(όπου I είναι ο αναστολέας και EI το σύμπλοκο ενζύμου-αναστολέα)



Όλα τα είδη αντιστρεπτών αναστολέων χαρακτηρίζονται από την σταθερά διαστάσεως του αναστολέα  $K_i$ , η οποία αφορά τη διάσταση του συμπλόκου EI και επηρεάζει την  $K_M$  ή την  $V_{max}$  του ενζύμου με τον όρο  $1+[I]/K_i$ .

$$K_i = [E][I] / [EI]$$

Στη **συναγωνιστική αναστολή**, ο αναστολέας (I) δεσμεύεται αμφίδρομα στο ενεργό κέντρο του ενζύμου και συναγωνίζεται με το υποστρώμα (S) για δέσμευση στο ενεργό κέντρο. Ο αναστολέας αυτός καλείται συναγωνιστικός. Όταν υπάρχει συναγωνιστικός αναστολέας, η ταχύτητα της αντίδρασης μπορεί να φτάσει τη μέγιστη τιμή της  $V_{max}$ , διότι αυξάνοντας την ποσότητα του υποστρώματος η αναστολή μπορεί να υπερνικηθεί. Η σφραγίδα γνησιότητας της συναγωνιστικής αναστολής είναι ότι η δράση του αναστολέα μπορεί να υπερνικηθεί από αρκετά υψηλή συγκέντρωση υποστρώματος. Εντούτοις, η φαινομενική τιμή της  $K_M$  μεταβάλλεται. Αυτή η νέα τιμή της  $K_M$  είναι αριθμητικά ίση με:

$$\text{φαινομενική } K_M = K_M (1 + [I] / K_i)$$

(όπου [I] είναι η συγκέντρωση του αναστολέα και  $K_i$  είναι η σταθερά διάστασης του συμπλόκου ενζύμου-αναστολέα)

Καθώς αυξάνεται η τιμή [I], αυξάνεται και η τιμή  $K_M$ , αλλά η  $V_{max}$  δεν επηρεάζεται.

Η εξίσωση Michaelis - Menten στο σύστημα με συναγωνιστική αναστολή είναι της μορφής:

$$V = \frac{V_{max} [S]}{[S] + K_M (1 + [I]/K_i)}$$

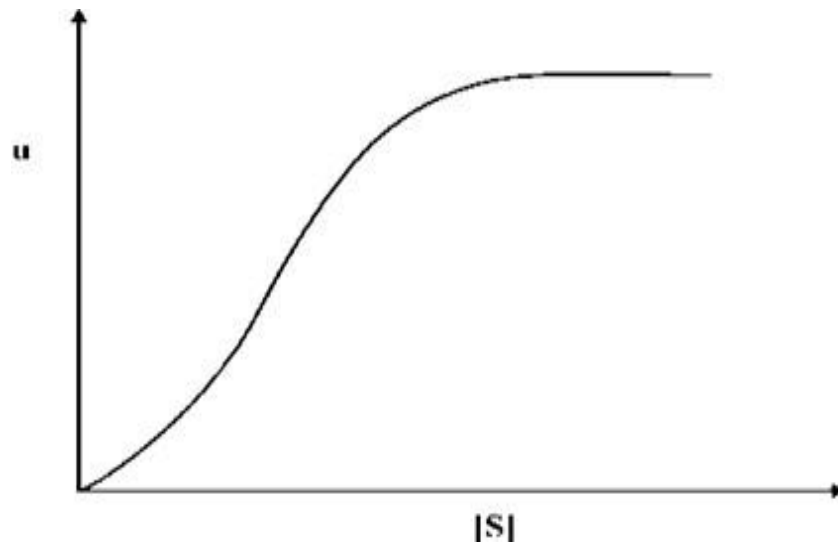
Παρατηρούμε ότι η μέγιστη ταχύτητα  $V_{max}$  δεν μεταβάλλεται, ενώ η τιμή της σταθεράς Michaelis μεγαλώνει κατά το ποσό  $([I]K_i + 1)$ . Όταν η συγκέντρωση του αναστολέα είναι μηδέν, ή όταν η σταθερά  $K_i$ , που ορίζεται ως η σταθερά δημιουργίας του συμπλόκου EI, είναι πολύ μικρή, δηλαδή υπάρχει μικρή αγχιστεία μεταξύ ενζύμου και αναστολέα, δεν φανερώνεται η αναστολή, με

αποτέλεσμα η  $K_M$  να είναι φυσιολογική. Κάτω από αυτές τις συνθήκες, η συγκέντρωση του υποστρώματος είναι τόσο μεγάλη, δηλαδή η  $[S]$  πάει να πάρει την τιμή που μας δίνει η μέγιστη ταχύτητα, ώστε ο όρος  $K_i$  να γίνεται πάλι μηδαμινός, με αποτέλεσμα η φυσιολογική  $V_{max}$  να μη μεταβάλλεται. Λόγω λοιπόν της μορφής του παρονομαστή στην εξίσωση, η μεγαλύτερη αναστολή εμφανίζεται όταν η συγκέντρωση του αναστολέα, δηλαδή η τιμή της  $[I]$ , είναι ψηλή ή όταν η τιμή της  $[S]$  είναι χαμηλή. Αντίθετα, η αναστολή εξαφανίζεται όταν η συγκέντρωση του αναστολέα είναι πολύ χαμηλή ή όταν η συγκέντρωση του υποστρώματος είναι πολύ ψηλή [Γεωργάτσος, Γιουψάνης, Κυριακίδης 2001] [Γεωργάτσος, 2005].

Στη **μη-συναγωνιστική αναστολή**, το υπόστρωμα μπορεί να προσδένεται στο σύμπλοκο ενζύμου-αναστολέα. Εντούτοις, το σύμπλοκο ενζύμου-αναστολέα-υποστρώματος δεν παράγει προϊόν. Δεδομένου ότι ο αναστολέας συνδέεται σε διαφορετική περιοχή από αυτήν του υποστρώματος, η αύξηση της συγκέντρωσης του υποστρώματος δεν ωφελεί. Στην ουσία ο αναστολέας ελαττώνει τη συγκέντρωση του λειτουργικού ενζύμου. Το ένζυμο που απομένει συμπεριφέρεται ως ένα περισσότερο αραιό διάλυμα του ενζύμου. Η  $K_M$  δεν επηρεάζεται αλλά η  $V_{max}$  ελαττώνεται. Η μη-συναγωνιστική αναστολή δεν μπορεί να υπερνικηθεί με την αύξηση της συγκέντρωσης του υποστρώματος [Stryer L. et al., 2012].

Η κινητική Michaelis-Menten, όπως έχει τροποποιηθεί και επεκταθεί για να περιλαμβάνει και αντιστρεπτές αντιδράσεις και αντιδράσεις δύο ή περισσότερων υποστρωμάτων, ισχύει για πάρα πολλές ενζυμικές αντιδράσεις. Τα **αλλοστερικά ένζυμα** όμως δεν υπακούουν σε αυτή. Τα αλλοστερικά ένζυμα αποτελούνται από πολλαπλές υπομονάδες και πολλαπλά ενεργά κέντρα και δίνουν μια σιγμοειδή σχέση ανάμεσα στην αρχική ταχύτητα αντίδρασης ( $V_o$ ) και στη συγκέντρωση του υποστρώματος  $[S]$  (Εικόνα 35). Σε ένα αλλοστερικό ένζυμο η σύνδεση του υποστρώματος στο ενεργό κέντρο μιας υπομονάδας αλλάζει τη μοριακή του διαμόρφωση. Η αλλαγή αυτή μεταδίδεται στις άλλες υπομονάδες συνεργειακά και μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένη ή μειωμένη δραστηριότητα των άλλων υπομονάδων για τη σύνδεση άλλων μορίων υποστρώματος. Επιπλέον, η δραστηριότητα των αλλοστερικών ενζύμων μπορεί να μεταβληθεί από ρυθμιστικά μόρια που προσδένονται αντιστρεπτά σε ειδικές περιοχές, διαφορετικές από τα καταλυτικά κέντρα και μπορεί να επηρεάσει την ενζυμική ενεργότητα. Συνήθως οι αλλοστερικοί τροποποιητές επηρεάζουν την τάση σύνδεσης της ενεργής περιοχής με το υπόστρωμα, υπάρχουν ωστόσο και αλλοστερικά συστήματα στα οποία αλλάζει η ταχύτητα μετατροπής του συμπλόκου ES σε προϊόντα. Η

σταθερά Michaelis  $K_M$  δεν χρησιμοποιείται με αλλοστερικά ένζυμα [Stryer L. et al., 2012].



**Εικόνα 35: Κινητική ενός αλλοστερικού ενζύμου:** Τα αλλοστερικά ένζυμα εμφανίζουν σιγμοειδή εξάρτηση της ταχύτητας της αντίδρασης από τη συγκέντρωση του υποστρώματος [Stryer L. et al., 2012].

**5<sup>ο</sup> ΜΕΡΟΣ**

**ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ**

**ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

## 5.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΦΩΣΦΟΡΥΛΑΣΗΣ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ b ΑΠΟ ΣΚΕΛΕΤΙΚΟΥΣ ΜΥΣ ΚΟΥΝΕΛΙΟΥ:

Η απομόνωση της μυϊκής φωσφορυλάσης του γλυκογόνου από σκελετικούς μυς κουνελιού γίνεται σύμφωνα με τη μέθοδο των Fischer & Krebs (1962), με μικρές μόνο τροποποιήσεις (χρησιμοποίηση 2-μερκαπτοαιθανόλης αντί L-κυστεΐνης ως αναγωγικού παράγοντα) [Melpidou & Oikonomakos, 1983].

### Υλικά:

- Κουνέλια ποικιλίας *oryctolacus cunicullus* (3 αρσενικά μετρίου μεγέθους)
- Ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης ενζύμου, 50:50:1, pH6.8 (50 mM β-φωσφογλυκερόλης, /HCl, 50 mM β-μερκαπτοαιθανόλης, 1 mM EDTA, 0.5mM DTT-διθειοθρεϊτόλης)
- Κεκορεσμένο διάλυμα όξινου ανθρακικού καλίου (KHCO<sub>3</sub>)
- Διάλυμα οξικού οξέος CH<sub>3</sub>COOH 1N
- Διάλυμα θειϊκού αμμωνίου κορεσμού 90%, 3.6M
- Ρυθμιστικό διάλυμα Tris [τρис-(υδροξυμεθυλο)-αμινομεθανίου]/HCl 0.001M] (pH 7.5)
- Διάλυμα Tris 2.0M (αρύθμιστου pH)
- Διάλυμα β-μερκαπτοαιθανόλης 0.3M (pH 7.0)
- Διάλυμα EDTA (αιθυλενο-διαμινο-τετραοξικού οξέος) 0.1M (pH 7.0)
- Διάλυμα AMP (5'-φωσφορικής αδενοσίνης) 0.1M, pH7.0
- Διάλυμα (CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>Mg 1.0M
- Γλυκερόλη
- Μεμβράνες διαπίδυσης (οι οποίες έχουν υποστεί κατεργασία με 1% NaCO<sub>3</sub> και 10mM EDTA στους 100°C, συνεχείς εκπλύσεις με απιονισμένο ύδωρ πριν από τη χρήση τους και αποθήκευση σε 20% αιθανόλη στους 4°C )

### **Όργανα:**

- Φυγόκεντρος
- Πεχάμετρο
- Φασματοφωτόμετρο
- Χρονόμετρο
- Αναλυτικός ζυγός

### **Πορεία:**

**Βήμα 1<sup>ο</sup>: Παραλαβή μυϊκού ιστού και εκχύλιση του ενζύμου από αυτόν.**

Αρχικά αφαιρούνται οι σκελετικοί μυς από 3 κουνέλια. Οι μυς αλέθονται με μηχανή κιμά και ζυγίζονται. Πραγματοποιούνται 3 εκχυλίσες με απιονισμένο ύδωρ εν ψυχρώ. Οι δύο πρώτες με όγκο ύδατος αριθμητικά ίσο με το βάρος των μυών και η τρίτη με όγκο ύδατος αριθμητικά ίσο με το μισό του βάρους των μυών. Κάθε φορά το εκχύλισμα διηθείται μέσω γάζας. Η συνολική διάρκεια των εκχυλίσεων δεν πρέπει να ξεπερνάει τα **30 λεπτά**. Το εκχύλισμα που συλλέγεται φιλτράρεται μέσω υαλοβάμβακα για την απομάκρυνση των λιπαρών ουσιών και των αιωρούμενων σωματιδίων.

**Βήμα 2<sup>ο</sup>: Όξινη καταβύθιση άλλων ενζύμων**

Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται στο 5.1-5.2 με προσθήκη διαλύματος  $\text{CH}_3\text{COOH}$  1N υπό ελαφρά ανάδευση. Το εκχύλισμα αφήνεται για 5 min σε πάγο. Λόγω της κατακρήμνισης των πρωτεϊνών, η θολερότητα του εκχυλίσματος αυξάνεται. Οι πρωτεΐνες απομακρύνονται με φυγοκέντρηση (5000rpm) για 30min σε θερμοκρασία 0-4°C. Το υπερκείμενο διηθείται με αντλία κενού Buchner εν ψυχρώ, για την απομάκρυνση των υπολειμμάτων αιωρούμενου υλικού. Ακολουθεί ρύθμιση του pH στο 6.8 με κορεσμένο  $\text{KHCO}_3$  και ογκομέτρηση του διαλύματος.

### Βήμα 3<sup>ο</sup>: Καταβύθιση με θειϊκό αμμώνιο

Το ένζυμο καταβυθίζεται με θειϊκό αμμώνιο κορεσμού 41%, με προσθήκη όγκου διαλύματος θειϊκού αμμωνίου κορεσμού 90% ίσο ως προς 0.837 για κάθε L ενζυμικού διαλύματος. Το διάλυμα παραμένει στους 4 °C για περίπου 16 ώρες. Στη συνέχεια το υπερκείμενο αποχύνεται με χρήση αντλίας και το ίζημα συλλέγεται με φυγοκέντρηση στα 5000rpm για 30min σε θερμοκρασία 4°C. Το ίζημα διαλυτοποιείται στον ελάχιστο δυνατό όγκο απιονισμένου ύδατος σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Ακολουθεί διαπίδυση στους 4°C έναντι ρυθμιστικού διαλύματος Tris 0.001M (pH 7.5) για 16 ώρες.

### Βήμα 4<sup>ο</sup>: Θερμική κατεργασία σε υψηλό pH

Το διάλυμα συλλέγεται και διαυγάζεται με φυγοκέντρηση στις 5500rpm για 30min στους 0-4°C. Ακολουθεί προσθήκη διαλύματος 2-μερκαπτοαιθανόλης 0.3M pH 7.0 όγκου ίσο με το 1/9 του όγκου του πρωτεϊνικού διαλύματος, διαλύματος EDTA 0.1M pH 7.0 ίσο με το  $5 \times 10^{-3}$  του πρωτεϊνικού διαλύματος και της προστιθέμενης μερκαπτοαιθανόλης και αλκαλικού διαλύματος Tris για ρύθμιση του pH στα 8.8. Μετά από επώαση του μίγματος στους 37°C για μια ώρα με ταυτόχρονη ανάδευση ανά τακτά διαστήματα και ψύξη σε θερμοκρασία δωματίου, προστίθεται διάλυμα CH<sub>3</sub>COOH 1N, για ρύθμιση του pH στο 7.0. Στη συνέχεια, το μίγμα φυγοκεντρείται στις 15000rpm για 10min σε θερμοκρασία 0-4°C και το υπερκείμενο (ενζυμικό διάλυμα) ογκομετρείται.

### Βήμα 5<sup>ο</sup>: Κρυστάλλωση και ανακρυστάλλωση

Η κρυστάλλωση πραγματοποιείται με την προσθήκη 1ml AMP 0.1M (pH 7.0) και (CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>Mg 1M (pH 7.0) ανά 100mL υπερκείμενου διαλύματος, εντός των σωλήνων φυγοκέντρησης, (το AMP και το (CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>Mg διευκολύνουν την

κρυστάλλωση). Το μίγμα αφήνεται στους 0°C για τουλάχιστον 6 ώρες όπου και ολοκληρώνεται η κρυστάλλωση της φωσφορυλάσης b του γλυκογόνου. Στη συνέχεια, οι κρύσταλλοι συλλέγονται με φυγοκέντρηση στις 15500rpm για 10min σε θερμοκρασία 0-4°C και διαλυτοποιούνται στους 30°C με όσο το δυνατό μικρότερο όγκο διαλύματος αραίωσης (β-GP/Merc/EDTA, 50:50:1, pH 6.8).

Το εναιώρημα επαναφυγοκεντρείται στις 17500rpm για 10min σε θερμοκρασία 25-30°C για την απομάκρυνση αδιάλυτων σωματιδίων (συσσωματωμάτων). Ακολουθεί η πρώτη ανακρυστάλλωση με την προσθήκη AMP και  $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$ , όπως ακριβώς στην κρυστάλλωση. Το μίγμα αφήνεται για κρυστάλλωση στους 0°C για ελάχιστο χρονικό διάστημα 6h. Τα στάδια της συλλογής, αναδιαλυτοποίησης και ανακρυστάλλωσης, γίνονται τουλάχιστον 4 φορές ενώ η τελευταία ανακρυστάλλωση γίνεται απουσία AMP και  $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$ .

#### **Βήμα 6<sup>ο</sup>: Συλλογή και αποθήκευση ενζύμου**

Οι κρύσταλλοι της φωσφορυλάσης b γλυκογόνου μετά την τελευταία ανακρυστάλλωση και συλλογή διαλυτοποιούνται με επώαση στους 30°C. Προσδιορίζεται η ενζυμική συγκέντρωση με φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 280 nm και προστίθεται ίσος όγκος γλυκερόλης. Το διάλυμα ενζύμου-γλυκερόλης αποθηκεύεται στους -20°C.



## 5.2 ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΦΩΣΦΟΡΥΛΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ:

### 5.2.1 Προσδιορισμός ειδικής δραστηριότητας GPb:

Η ειδική δραστηριότητα (specific activity,  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ ) αποτελεί έκφραση της ποσότητας, αλλά και της δραστηριότητας ενός ένζυμου. Ορίζεται ως τα  $\text{mg}$  του ένζυμου που προκαλούν μετατροπή 1  $\mu\text{mol}$  υποστρώματος (ή παρασκευής 1  $\mu\text{mol}$  προϊόντος), ανά 1 λεπτό σε καθορισμένες συνθήκες.

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου καταλύει την αντίδραση αποικοδόμησης του γλυκογόνου  $\text{Glycogen}_{(n)}$ , προς  $\text{Glycogen}_{(n-1)}$  και την απελευθέρωση 1 φωσφορικής γλυκόζης  $\text{glucose-1-P}$ .



Στο πειραματικό μέρος διεξάγεται η αντίθετη αντίδραση. Παρουσία δηλαδή του ενζύμου, δηλαδή μόρια 1-φωσφορικής γλυκόζης προστίθενται στο γλυκογόνο και απελευθερώνονται φωσφορικά ιόντα ( $\text{Pi}$ ) τα οποία μπορούν να μετρηθούν φασματοφωτομετρικά.

#### Πορεία:

Δείγμα από το ενζυμικό παρασκεύασμα αραιώνεται και λαμβάνεται το εναιώρημα ένζυμου περιεκτικότητας  $\sim 500 \mu\text{g/mL}$ . Σε δοκιμαστικό σωλήνα παρασκευάζεται το ενζυμικό μίγμα που περιέχει  $25 \mu\text{g}$  ενζύμου/ $\text{mL}$ , γλυκογόνο 0.2% (w/v) και ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης ένζυμου 5% (v/v). Σε δοκιμαστικό σωλήνα παρασκευάζεται επίσης το υπόστρωμα για  $\alpha\text{-D-Glc-1-P}$  2.0mM με προσθήκη 200 $\mu\text{L}$  υποστρώματος  $\alpha\text{-D-Glc-1-P}$  9.0mM, 18 $\mu\text{L}$  AMP 50mM και 502 $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$  (κατάλληλο για τέσσερα δείγματα).

Τοποθετείται το ενζυμικό μίγμα για επώαση στους  $30^\circ\text{C}$  επί 15 λεπτά και το υπόστρωμα επί περίπου 3 λεπτά. Μετά την επώαση, 180 $\mu\text{L}$  από το ενζυμικό μείγμα προστίθενται στον σωλήνα του υποστρώματος για να ξεκινήσει η

αντίδραση. Στις συνθήκες στις οποίες λαμβάνει χώρα η αντίδραση έχουμε: 5.0μg ένζυμου ανά mL, 1.0mM AMP, 0.2 % w/v γλυκογόνο, υπόστρωμα α-D- Glc-1-P 2.0mM, 50mM υδροχλωρικής τριαιθανολαμίνης, 100mM KCl και 1mM DTT. Επίσης η θερμοκρασία είναι 30°C και το pH 6.8. Ανά τακτά χρονικά διαστήματα (ενός λεπτού) λαμβάνονται δείγματα των 200μL από το μίγμα της αντίδρασης και προστίθενται σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιέχουν 50μL SDS 1.0% (παρουσία απορρυπαντικού το ένζυμο αποδιατάσσεται και αδρανοποιείται). Στα δείγματα γίνεται φωτομετρικός προσδιορισμός φωσφόρου (προϊόν αντίδρασης) με την μέθοδο που περιγράφεται παρακάτω. Εκτός από τα δείγματα, γίνεται προσδιορισμός και σε τυφλά, όπως α-D- Glc-1-P (λόγω της φυσικής υδρόλυσης) και γλυκογόνου (λόγω της παρουσίας φωσφορικών).

### 5.2.2 Προσδιορισμός σταθεράς Michaelis-Menten ( $K_M$ ) της GPb:

Η σταθερά Michaelis-Menten ( $K_M$ , mol) αποτελεί μέτρο της συγγένειας του ενζύμου ως προς το υπόστρωμα και ορίζεται ως η συγκέντρωση του υποστρώματος που αντιστοιχεί στο ήμισυ της μέγιστης ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης ( $V_{max}$ ). Ο προσδιορισμός απαιτεί την κινητική μελέτη του ένζυμου παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων υποστρώματος (α-D- Glc-1-P).

#### Πορεία:

Σε δοκιμαστικό σωλήνα παρασκευάζεται το ενζυμικό μίγμα που περιέχει 25μg ενζύμου/mL, γλυκογόνο 5% (w/v) και ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης ένζυμου 5% (v/v). Σε μια σειρά δοκιμαστικών σωλήνων παρασκευάζονται επίσης όλα τα διαλύματα υποστρωμάτων α-D- Glc-1-P 2.0, 4.0, 6.0, 10 και 20mM, με προσθήκη 200μL από το αντίστοιχο υπόστρωμα α-D- Glc-1-P, 18μL AMP 50mM και 502μL H<sub>2</sub>O.

Το ενζυμικό μείγμα τοποθετείται για επώαση στους 30°C επί 15 λεπτά και τα υποστρώματα επί περίπου 3 λεπτά. Στη συνέχεια, για την εκκίνηση της αντίδρασης σε όλους τους σωλήνες των υποστρωμάτων σταδιακά προστίθενται 180μl ενζυμικού μίγματος. Στις συνθήκες αυτές, στις οποίες λαμβάνει χώρα η αντίδραση, έχουμε: 5.0μg ένζυμο/mL, AMP 1.0mM, γλυκογόνο 1%, υπόστρωμα α-D- Glc-1-P 2.0-20mM, 50 mM υδροχλωρικής τρις-αιθανολαμίνης, 100 mM KCl και 1 mM DTT. Επίσης η θερμοκρασία είναι 30°C και το pH 6.8. Κάθε ένα λεπτό (σε χρόνους 1',2',3',4') λαμβάνονται δείγματα των 200μL από το μείγμα της

αντίδρασης και προστίθενται σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιέχουν 50μL SDS 1.0% .

Στα δείγματα γίνεται προσδιορισμός φωσφόρου (προϊόν αντίδρασης) με την μέθοδο που περιγράφεται παρακάτω. Εκτός από τα δείγματα, γίνεται προσδιορισμός και σε τυφλά, όπως α-D- Glc-1-P (λόγω της φυσικής υδρόλυσης) και γλυκογόνου (λόγω της πιθανής παρουσίας φωσφορικών).

### 5.3 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ $IC_{50}$ ΑΝΑΣΤΟΛΕΑ:

Η παρουσία αναστολέα στο μίγμα της αντίδρασης έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της ταχύτητας σύνθεσης του γλυκογόνου και της απελευθέρωσης των ορθοφωσφορικών ιόντων. Η μείωση αυτή μπορεί να εκφραστεί ως αναστολή σύμφωνα με γνωστά μοντέλα ενζυμικής αναστολής [Segel, 1975].

Οι αναστολείς του καταλυτικού κέντρου της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου δρουν σύμφωνα με την πλήρως συναγωνιστική αναστολή (fully competitive inhibition), αφού η σύνδεσή τους στο καταλυτικό κέντρο εμποδίζει τη σύνδεση του υποστρώματος και κατ' επέκταση τη δράση του ενζύμου. Σύμφωνα με το μοντέλο της πλήρους συναγωνιστικής αναστολής, ο αναστολέας συνδέεται στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου «μιμούμενος» το υπόστρωμα και εμποδίζει το σχηματισμό του συμπλόκου ενζύμου-υποστρώματος.

Η σταθερά  $IC_{50}$  ορίζεται ως η συγκέντρωση του αναστολέα η οποία προκαλεί 50% μείωση της ενζυμικής δραστηριότητας. Ο προσδιορισμός της προϋποθέτει την μελέτη της κινητικής του ενζύμου με κάποιο αναστολέα στην περιοχή του  $IC_{50}$  και για συγκεκριμένη συγκέντρωση G1P (1-φωσφορικής γλυκόζης).

#### Υλικά :

- Απιονισμένο ύδωρ
- Διάλυμα ενζύμου
- Διάλυμα 1-φωσφορικής γλυκόζης (α-D- Glc-1-P) 18mM
- Διάλυμα 5' μονοφωσφορικής αδενοσίνης (AMP) 50mM

- Ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης ενζύμου, 50:50:1, pH 6.8 (50mM β-φωσφογλυκερόλης (β- GP), 50mM β-μερκαπτοαιθανόλης, 1mM EDTA)
- Γλυκογόνο 1 % (w/v)
- Διάλυμα SDS 1%
- Διάλυμα φωσφορικών ιόντων (Pi) 1mM, pH= 6.8
- Διάλυμα του αναστολέα

### **Όργανα:**

- Υδατόλουτρο ( ρυθμισμένο να διατηρεί τη θερμοκρασία πάντα στους 30° C.)
- Φασματοφωτόμετρο (ρυθμισμένο στα 850nm)
- Δοκιμαστικούς σωλήνες
- Ζυγός
- Πιπέτες
- Συσκευή vortex
- Συσκευή μέτρησης pH (pH μετρο)
- Χρονόμετρο

### **Πορεία :**

#### **5.3.1 Παρασκευή διαλύματος GPb-γλυκογόνου:**

Από το εναιώρημα του ενζύμου που φυλάσσεται σε γλυκερόλη παίρνουμε 10μl και το αραιώνουμε σε 1 ml ρυθμιστικού διαλύματος 50:50:1. Το διάλυμα φωτομετρείται σε μήκος κύματος 280 nm για τον ακριβή προσδιορισμό της συγκεντρώσεως της GPb, με κυψελίδα χαλαζία οπτικής διαδρομής  $b=1\text{cm}$  (ξέρουμε προς ο συντελεστής μοριακής απορρόφησης του ενζύμου είναι 1.32).

Εν συνεχεία παρασκευάζεται ενζυμικό διάλυμα σε δοκιμαστικό σωλήνα το οποίο περιέχει 25μg/mL GPb, γλυκογόνο 10% w/v, και ρυθμιστικό διάλυμα 50:50:1 5% v/v, έτσι ώστε με την προσθήκη του διαλύματος με το υπόστρωμα η αντίδραση να λαμβάνει χώρα στις εξής συνθήκες: ένζυμο 5.0 μg/ mL, AMP 1.0 mM, γλυκογόνο 0.2 % w/v και υπόστρωμα α-D- Glc-1-P σταθερής συγκέντρωσης

και αναστολέα μεταβαλλόμενης. Στη συνέχεια το ενζυμικό διάλυμα τοποθετείται για επώαση 15 min σε υδατόλουτρο με σταθερή θερμοκρασία 30°C.

### 5.3.2 Παρασκευή διαλύματος υποστρωμάτων:

#### Αξιολόγηση εκχυλισμάτων παραπροϊόντων ροδιού σε διάλυμα DMSO

Παρασκευάζονται διαλύματα με διαφορετικές συγκεντρώσεις αναστολέα, ώστε να βρεθεί η IC<sub>50</sub>. Η σταθερή συγκέντρωση της α-D- Glc-1-P είναι 9mM, του AMP 50mM και του DMSO 100%. Μετά την προσθήκη του ενζυμικού διαλύματος (180μl) η συγκέντρωση της α-D- Glc-1-P είναι 2 mM, της AMP 1mM και του DMSO 2%. Επίσης συμπληρώνεται με απιονισμένο ύδωρ μέχρι τελικού όγκου 720 μL (Πίνακας 3). Τέλος σε κάθε σειρά πειραμάτων παρασκευάζεται και ένα πείραμα ελέγχου (control) το οποίο δεν περιέχει αναστολέα.

Πίνακας 3:

	Control	Διάλυμα με αναστολέα
α-D- Glc-1-P [9mM]	200 μL	200 μL
AMP [50mM]	18 μL	18 μL
Αναστολέας	-	18 μL
*DMSO 100%	18 μL	-
H <sub>2</sub> O	484 μL	484 μL
Τελικός όγκος (V <sub>T</sub> )	720μL	720μL

\*DMSO: Είναι ένα άχρωμο, ελαιώδες, ελαφρά ιξώδες υγρό. Διαλύει εύκολα μη πολικές ενώσεις και πολλά ανόργανα άλατα.

#### Αξιολόγηση εκχυλισμάτων παραπροϊόντων ροδιού σε υδατικό διάλυμα

Παρασκευάζονται διαλύματα με διαφορετικές συγκεντρώσεις αναστολέα, ώστε να βρεθεί η IC<sub>50</sub>, και σταθερή συγκέντρωση α-D- Glc-1-P 9mM και AMP 50mM ώστε μετά την προσθήκη του ενζυμικού διαλύματος (180μl) η συγκέντρωση της α-D- Glc-1-P να είναι 4 mM και της AMP 1mM. Επίσης συμπληρώνεται με απιονισμένο ύδωρ μέχρι τελικού όγκου 720 μL (Πίνακας 4).

Τέλος σε κάθε σειρά πειραμάτων παρασκευάζεται και ένα πείραμα ελέγχου (control) το οποίο δεν περιέχει αναστολέα.

**Πίνακας 4:**

	<b>Control</b>	<b>Διάλυμα με αναστολέα</b>
<b>α-D- Glc-1-P [9mM]</b>	200 $\mu$ L	200 $\mu$ L
<b>AMP [50mM]</b>	18 $\mu$ L	18 $\mu$ L
<b>Αναστολέας</b>	-	x $\mu$ L
<b>H<sub>2</sub>O</b>	502 $\mu$ L	720-(200+18+X) $\mu$ L
<b>Τελικός όγκος (V<sub>T</sub>)</b>	720 $\mu$ L	720 $\mu$ L

Τα διαλύματα υποστρώματος τοποθετούνται πριν την εκτέλεση του πειράματος στο υδατόλουτρο ώστε να αποκτήσουν την ίδια θερμοκρασία με το ενζυμικό διάλυμα.

### 5.3.3 Εκτέλεση του Πειράματος:

Μετά την επώαση του ενζυμικού διαλύματος, μεταφέρονται 180 $\mu$ l από το ενζυμικό μίγμα στον χρόνο 0 σε κάθε διάλυμα υποστρώματος όγκου 720  $\mu$ L, ώστε να πραγματοποιηθεί η αντίδραση. Ακολουθώντας, ανά 1 λεπτό (σε χρόνους 1', 2', 3', 4'), λαμβάνονται από 200  $\mu$ L και μεταφέρονται σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιέχουν 50 $\mu$ L SDS 1%. Έτσι σταματά η ενζυμική αντίδραση, αφού παρουσία απορρυπαντικού το ένζυμο αποδιατάσσεται και αδρανοποιείται. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται για κάθε μία διαφορετική συγκέντρωση αναστολέα.

Στα δείγματα που έχουν ληφθεί προστίθενται 2.5 ml διαλύματος ασκορβικού οξέος – μολυβδαινικού αμμωνίου σε αναλογία 1/4 ανά δοκιμαστικό σωλήνα, σε ίσα χρονικά διαστήματα. Τα δείγματα επωάζονται στους 30°C για 15min και ακολουθεί φωτομέτρηση τους σε μήκος κύματος 850nm. Από τα αποτελέσματα της φωτομέτρησης υπολογίζεται ο αριθμός των P<sub>i</sub> που έχουν απελευθερωθεί από την κάθε αντίδραση. Ακολουθεί η επεξεργασία των δεδομένων με το πρόγραμμα Grafit, προκειμένου να προσδιοριστεί η IC<sub>50</sub>. Εκτός από τα δείγματα, γίνεται προσδιορισμός και σε τυφλά α-D- Glc-1-P, λόγω της φυσικής υδρόλυσης της, αλλά και του ενζυμικού διαλύματος, λόγω της πιθανής παρουσίας φωσφορικών.

## 5.4 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΡΘΟΦΩΣΦΟΡΙΚΩΝ ΙΟΝΤΩΝ:

Ο προσδιορισμός των ορθοφωσφορικών ιόντων αποτελεί μια ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδο στην βιοχημεία, κυρίως στον προσδιορισμό δραστηριότητας ενζύμων που καταλύουν αντιδράσεις στις οποίες συμμετέχουν οργανοφωσφορικές ενώσεις. Στην περίπτωση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, η ελευθέρωση των ορθοφωσφορικών ιόντων κατά την πορεία σχηματισμού του γλυκογόνου επιτρέπει την κινητική μελέτη του ενζύμου. Η χρησιμότητα του προσδιορισμού του ανόργανου φωσφόρου οδήγησε σε μια συνεχή τροποποίηση και βελτιστοποίηση της αρχικής μεθόδου που προτάθηκε από τους Fiske και Subbarow (1925).

### 5.4.1 Μέθοδος ασκορβικού οξέος [Saheki et al, 1985]:

Η μέθοδος στηρίζεται στον σχηματισμό έγχρωμης ετεροπολυμεταλλικής ένωσης σε ήπιο όξινο περιβάλλον παρουσία οξικού ψευδαργύρου και αναγωγή με ασκορβικό οξύ και φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 850 nm.

#### Υλικά

(Τα παρακάτω διαλύματα παρασκευάζονται την ίδια μέρα που θα εκτελεστεί το πείραμα):

**Διάλυμα μολυβδαινίου**, pH 5.0 (Το διάλυμα φυλάσσεται σε σκουρόχρωμο γυάλινο δοχείο και μακριά από το φως). Το διάλυμα αποτελείται από μολυβδαινικό αμμώνιο 15 mM και οξικό ψευδάργυρο 100 mM. Η ρύθμιση του pH γίνεται με ατμίζων HCl 10N.

**Διάλυμα ασκορβικού οξέος** 10% (w/v), pH 5.0. Η ρύθμιση του pH γίνεται με NaOH 10N. Ανάμιξη 4:1 όγκου αντιδραστηρίου μολυβδαινίου προς ασκορβικού οξέος. Το νέο διάλυμα φυλάσσεται μακριά από το φως και χρησιμοποιείται μετά από **15 min** από την παρασκευή του (δλδ. ανάμιξη) και όχι μετά από μεγάλο χρονικό διάστημα (>3hrs).

### **Πορεία:**

Στα δείγματα που λαμβάνονται από το κινητικό πείραμα προστίθενται 2.5mL από το αντιδραστήριο χρώσης. Μετά από ισχυρή ανάμιξη με Vortex οι δοκιμαστικοί σωλήνες τοποθετούνται σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 30° C για **15min**. Ακολουθεί φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 850nm. Επίσης γίνεται προσδιορισμός σε πρότυπο δείγμα φωσφορικών.

## **5.5 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΥΦΛΩΝ:**

Η μέθοδος προσδιορισμού της IC<sub>50</sub> βασίζεται στον προσδιορισμό των ορθοφωσφορικών ιόντων που προκύπτουν κατά την αντίδραση σύνθεσης του γλυκογόνου που καταλύεται από την GPb. Για το λόγο αυτό θα πρέπει να διορθωθούν οι απορροφήσεις λόγω της παρουσίας ορθοφωσφορικών ιόντων τα οποία δεν προκύπτουν από την δράση του ενζύμου. Έτσι παρασκευάζονται τα παρακάτω τυφλά:

- Τυφλό νερού για τον μηδενισμό του φωτομέτρου.
- Τυφλό με την συγκέντρωση της α-D- Glc-1-P που χρησιμοποιείται, λόγω της φυσικής υδρόλυσης της.
- Τυφλό γλυκογόνου (ενζυμικού διαλύματος) λόγω της πιθανής παρουσίας φωσφορικών.
- Παρασκευάζονται από δυο τυφλά για κάθε περίπτωση, εκτός του νερού, και λαμβάνεται ο μέσος όρος των απορροφήσεων τους. Επίσης, παρασκευάζεται γνωστό πρότυπο διάλυμα ορθοφωσφορικών ιόντων από την οπτική απορρόφηση του όποιου, εξάγεται η τιμή της απορρόφησης του κάθε μολ Pi.



## 5.6 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΚΙΝΗΤΙΚΩΝ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ- ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ GRAFIT:

Αρχικά οι απορροφήσεις των δειγμάτων μετά από διόρθωση (ως προς την απορρόφηση λόγω της φυσικής υδρόλυσης της α-D- Glc-1-P και της παρουσίας φωσφορικών στο ενζυμικό μείγμα) μετατρέπονται σε μmol φωσφορικών σύμφωνα με την πρότυπη καμπύλη φωσφορικών. Ακολουθεί ο προσδιορισμός της ειδικής δραστηριότητας του ενζύμου παρουσία ή απουσία αναστολέα.

Για τον υπολογισμό της σταθεράς Michaelis-Menten ( $K_M$ , mol) χρησιμοποιείται η εξίσωση Michaelis-Menten,

$$V = \frac{V_{\max} S}{K_m + S}$$

V: ταχύτητα

$V_{\max}$ : μέγιστη ταχύτητα

[S]: συγκέντρωση υποστρώματος

$K_M$ : σταθερά Michaelis-Menten.

Τέλος, γίνεται η καμπύλη  $V=f([S])$ , η οποία έχει μορφή κινητικής κορεσμού, και υπολογίζεται η συγκέντρωση που αντιστοιχεί στο ήμισυ της  $V_{\max}$ . Στον προσδιορισμό της σταθεράς  $IC_{50}$ , οι ειδικές δραστηριότητες παρουσία αναστολέα μετατρέπονται σε επί τοις εκατό αναστολή χρησιμοποιώντας την ειδική δραστηριότητα του ενζύμου απουσία αναστολέα.

## ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η αύξηση αριθμού των ασθενών που πάσχουν από ΣΔτ2 έχει οδηγήσει στην ανάγκη για εκτεταμένη έρευνα με στόχο το σχεδιασμό νέων εν δυνάμει υπογλυκαιμικών φαρμάκων, τα οποία έχουν στόχο ένζυμα και υποδοχείς που συμμετέχουν στον έλεγχο των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα και αποσκοπούν σε μία πιο αποτελεσματική αντιμετώπιση του ΣΔτ2 [Kurukulasuriya et al, 2003].

Το ήπαρ είναι ένα όργανο που έχει ως σκοπό να αποκαθιστά της ενεργειακές ανάγκες των άλλων ιστών. Η ηπατική φωσφορυλάση του γλυκογόνου (LGP), ένζυμο υπεύθυνο για την κινητοποίηση του γλυκογόνου στο ήπαρ, αποτελεί έναν ισχυρό υποψήφιο μοριακό στόχο για το σχεδιασμό νέων υπογλυκαιμικών φαρμάκων για τον έλεγχο της υπεργλυκαιμίας στο ΣΔτ2. Υπάρχει μια συνεχής έρευνα για ενώσεις που μπορούν να επιτύχουν τη ρύθμιση της παραγωγής γλυκόζης από το ήπαρ ώστε να βελτιώσουν τη θεραπεία του ΣΔτ2. Οι προσπάθειες για την ανακάλυψη νέων υπογλυκαιμικών σκευασμάτων έχουν ως στόχο την αναστολή της ανθρώπινης ηπατικής φωσφορυλάσης (HLGP), καθώς αυτή είναι ένα ένζυμο κλειδί στον ανθρώπινο μεταβολισμό, λόγω του κεντρικού της ρόλου στον έλεγχο του μεταβολισμού του γλυκογόνου και την απελευθέρωση της γλυκόζης. Ακριβώς γι' αυτό το ρόλο που διαδραματίζει, η LGP αξιοποιείται ως ένα μοντέλο για το σχεδιασμό ισχυρών αναστολέων της, (GPIs), ως πιθανοί νέοι υπογλυκαιμικοί παράγοντες, οι οποίοι θα μπορούν να εμποδίσουν την ενδογενή ανεπιθύμητη γλυκογονόλυση. Η αναστολή του ενζύμου αυτού έχει αποδειχθεί ότι μπορεί να βοηθήσει στον έλεγχο της κινητοποίησης του γλυκογόνου και τη μείωση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα των ασθενών με ΣΔτ2. Η φωσφορυλάση και η γλυκοκινάση αποτελούν δύο ένζυμα που φαίνεται να έχουν κατά κύριο λόγο τον έλεγχο της ρύθμισης της γλυκόζης που απελευθερώνεται από τα ηπατικά κύτταρα [Treadway et al., 2001] [Agius et al., 2001] [Kristiansen M., 2004].

Η παρούσα διατριβή αποτελεί μέρος της γενικότερης έρευνας που διεξάγεται στο *εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας* με στόχο τη μελέτη του ενζύμου της GP για την κατανόηση της μοριακής βάσης της αναγνώρισης αναστολέων από το ένζυμο και το σχεδιασμό εν δυνάμει υπογλυκαιμικών παραγόντων. Η μετέπειτα εφαρμογή μεθόδων πρωτεϊνικής κρυσταλλογραφίας για την ανάλυση της 3D δομής συμπλόκων ενζύμου-αναστολέα, σε υψηλή ευκρίνεια, μπορεί να οδηγήσει στο σχεδιασμό ενώσεων υψηλής συγγενείας και ρυθμιστικής ικανότητας στην ισορροπία αποικοδόμησης-σύνθεσης γλυκογόνου στο ΣΔτ2. Η βιοχημική μελέτη του ενζύμου αποτελεί σήμερα μία πορεία εργασιών με στόχο την ανακάλυψη ουσιών με δύο κυρίως

χαρακτηριστικά: υψηλή εκλεκτικότητα και υψηλή συγγένεια για την πρωτεΐνη-στόχο.

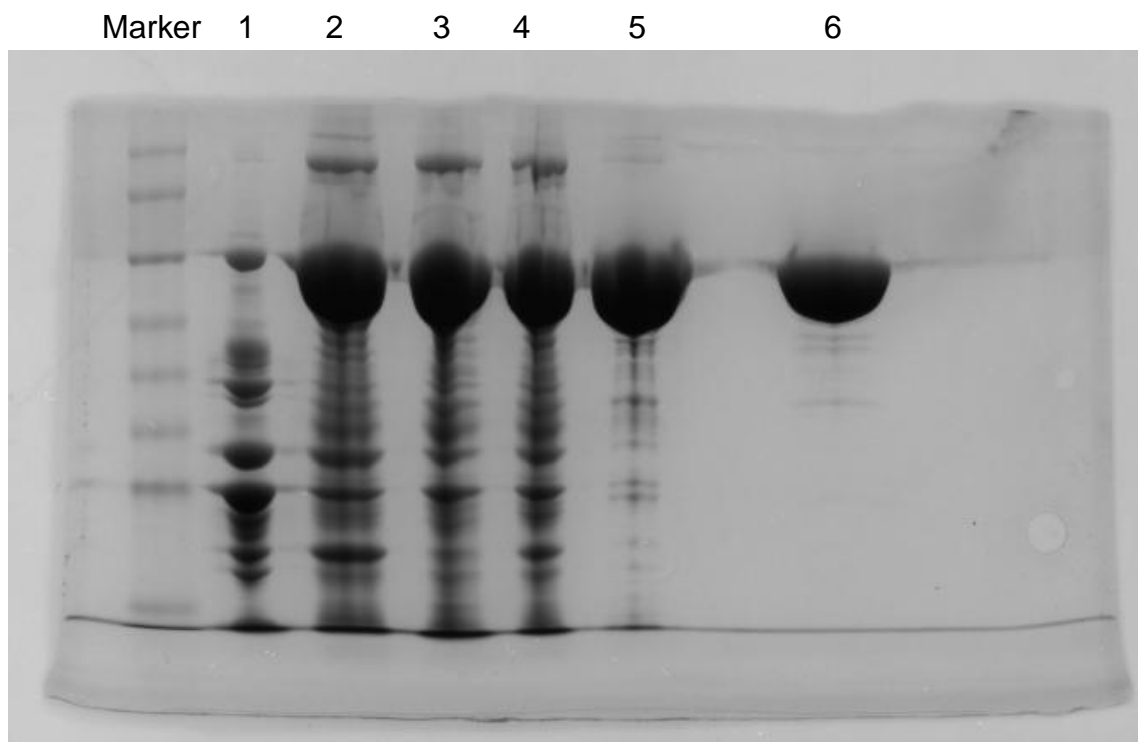
Παρόλο που ο πρωταρχικός στόχος είναι η ηπατική GP, το κρυσταλλογραφικό πρότυπο στο οποίο στηρίζεται ο σχεδιασμός ενώσεων στην παρούσα διατριβή είναι η μυϊκή GP. Η ηπατική GP είναι 80 % ομόλογη ως προς την αμινοξική ακολουθία με την μυϊκή GP, όμως η ομολογία μεταξύ των δυο ενζύμων είναι 100% στην περιοχή του ενεργού κέντρου.

Στο πλαίσιο της παρούσας διατριβής πραγματοποιήθηκε η κινητική μελέτη εκχυλισμάτων ροδιού για τον προσδιορισμό της  $IC_{50}$  έναντι της μυϊκής φωσφορυλάσης b του γλυκογόνου από μύες κουνελιού (RMGPb).

**6<sup>ο</sup> ΜΕΡΟΣ**  
**ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

## 6.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΦΩΣΦΟΡΥΛΑΣΗΣ $\beta$ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ (GP $\beta$ ):

Η φωσφορυλάση  $\beta$  του γλυκογόνου απομονώθηκε από σκελετικούς μύες κουνελιού σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφηκε στο πειραματικό μέρος (βλ. §5.1).



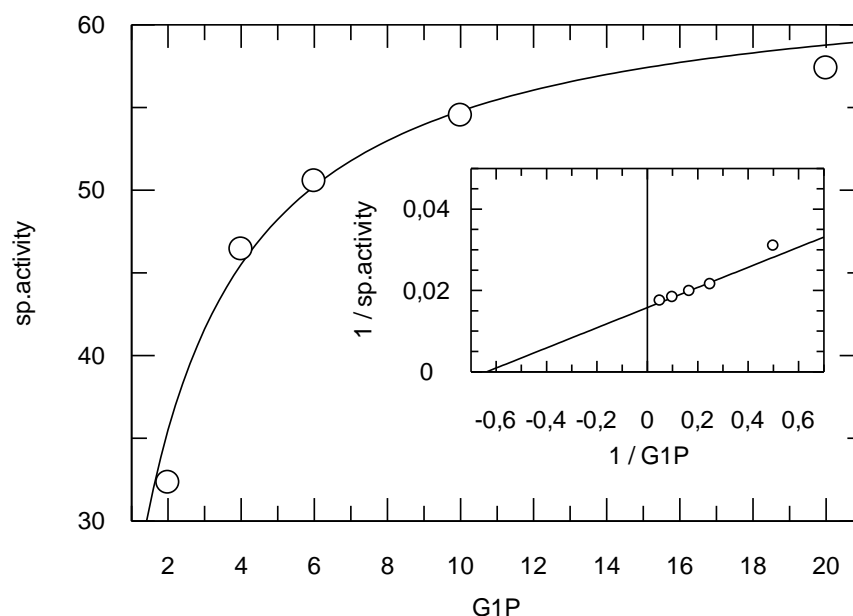
**Εικόνα 36:** Ηλεκτροφόρηση πηκτής δειγμάτων του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος, σε κάθε βήμα της απομόνωσης της GP $\beta$ . Αρχικά εμφανίζεται ο μάρτυρας. Στην πρώτη διαδρομή εμφανίζεται το πρωτεϊνικό εκχύλισμα μετά την όξινη καταβύθιση. Στην δεύτερη διαδρομή εμφανίζεται το δείγμα μετά την καταβύθιση με θειικό αμμώνιο. Στην τρίτη διαδρομή εμφανίζεται το δείγμα μετά την θερμική κατεργασία σε υψηλό pH. Στην τέταρτη διαδρομή εμφανίζεται το δείγμα μετά την πρώτη ανακρυστάλλωση. Στην πέμπτη διαδρομή εμφανίζεται το δείγμα κατά την τέταρτη ανακρυστάλλωση. Στην έκτη και τελευταία διαδρομή εμφανίζεται το δείγμα μετά το τέλος της διαδικασίας, όπου πλέον έχει απομονωθεί η πρωτεΐνη (GP $\beta$ ).

## 6.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΙΝΗΤΙΚΩΝ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ:

### 6.2.1 Κινητική μελέτη της φωσφορυλάσης b του γλυκογόνου:

Η σταθερά  $K_M$  (σταθερά Michaelis-Menten) αποτελεί το μέτρο της συγγένειας του ενζύμου προς το υπόστρωμα (Glc-1-P για το ένζυμο GPb) και εξαρτάται από τα χαρακτηριστικά του ενζύμου. Συγκεκριμένα, η  $K_M$  ορίζεται ως η συγκέντρωση του ενζύμου που επιτρέπει στην καταλυτική αντίδραση να προχωρά με ρυθμό μισό εκείνου της μέγιστης ταχύτητας ( $V_{max}$ ). Η σταθερά αυτή για τη μυϊκή φωσφορυλάση του κουνελιού κυμαίνεται μεταξύ 1.5 και 3.0 mM. Με στόχο τον χαρακτηρισμό του ενζύμου που απομονώθηκε έγινε προσδιορισμός της  $K_M$  (βλ. πειραματικό μέρος, §5.2.2)

Τα χαρακτηριστικά του ενζύμου βρέθηκαν να είναι:  $K_M=1.57 \pm 0.25$  mM και  $V_{max}= 63.38 \pm 2.26$   $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ . Στη παρακάτω εικόνα παρουσιάζεται η καμπύλη της ταχύτητας (ειδική δραστηριότητα, specific activity,  $\mu\text{mol Pi}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  ενζύμου) ως προς την συγκέντρωση του υποστρώματος (G1P).



**Εικόνα 37:** Διάγραμμα κινητικής μελέτης της φωσφορυλάσης b του γλυκογόνου (GPb), σε διάφορες συγκεντρώσεις του υποστρώματος της Glc-1-P [2, 4, 6, 10, 20 mM], στην κατεύθυνση σύνθεσης του γλυκογόνου, υπό σταθερή συγκέντρωση AMP [1mM] και γλυκογόνου 0.2% w/v . Το διάγραμμα (υπερβολή) παρουσιάζει την ταχύτητα ως προς τη συγκέντρωση του υποστρώματος, ενώ στο εσωτερικό φαίνεται το διάγραμμα διπλού αντιστρόφου (Enzyme Kinetics, Lineweaver Burk).

## 6.2.2 Κινητική μελέτη εκχυλισμάτων παραπροϊόντων επεξεργασίας ροδιού:

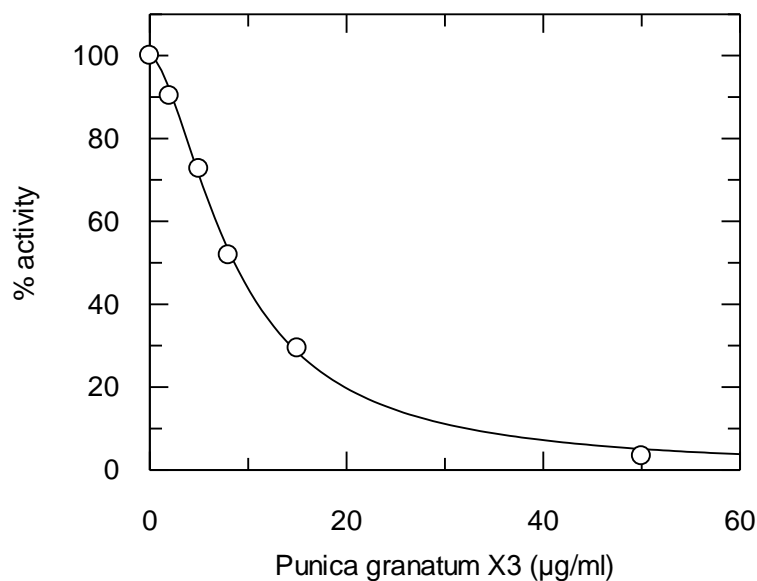
Για το σκοπό της εργασίας, πραγματοποιήθηκαν κινητικά πειράματα με τη φωσφορυλάση b του γλυκογόνου από μύες κουνελιού (RMGPb), προς τη κατεύθυνση σύνθεσης του γλυκογόνου, *in vitro*, για να εκτιμηθεί η ανασταλτική ικανότητα των εκχυλισμάτων ροδιού (*Punica Granatum*) ως προς τη δράση του ενζύμου. Ακολουθούν τα αποτελέσματα της κινητικής μελέτης και οι γραφικές παραστάσεις που προέκυψαν από το πρόγραμμα Grafit [Leatherberrow,1998]. Στον πίνακα 5 αναγράφονται τα εκχύλισμα *Punica Granatum* που μελετήθηκαν, οι συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν για τον προσδιορισμό των IC<sub>50</sub>, καθώς και οι τιμές των IC<sub>50</sub>.

Οι πειραματικές συνθήκες και ο προσδιορισμός των IC<sub>50</sub> αναφέρονται στο πειραματικό μέρος (βλ. §5.3). Η ενζυμική αντίδραση έλαβε χώρα σε σταθερές συγκεντρώσεις AMP [50mM], Glc-1-P [9mM] και σε διάφορες συγκεντρώσεις εκχυλισμάτων όπως φαίνεται στον πίνακα.

Πίνακας 5:

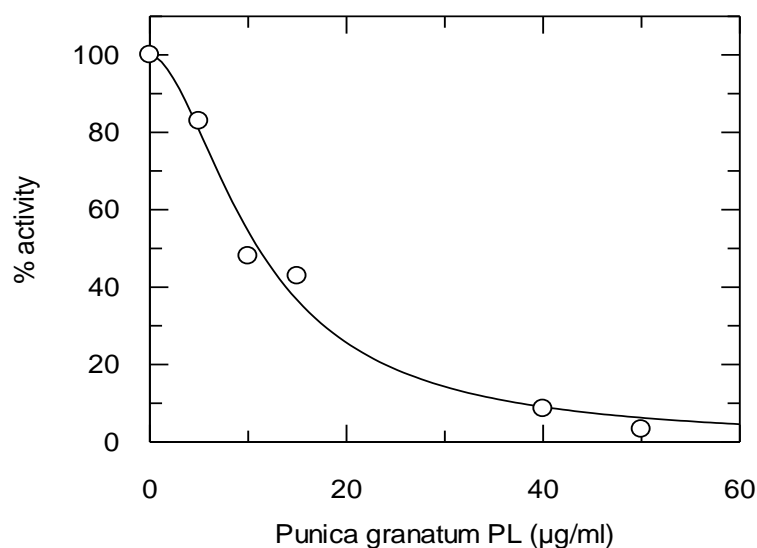
Inhibitor <i>Punica Granatum</i>	Συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν (μg/mL)	IC <sub>50</sub> (μg/mL)
Εκχύλισμα Ξ3 ρόδι	2, 5, 8, 15, 50	8,6686 ± 0,2122
Εκχύλισμα ΠΛ ρόδι	5, 10, 15, 40, 50	11,0516 ± 0,7734
Εκχύλισμα ΠΕ ρόδι	5, 10, 20, 40, 50	27,1553 ± 1,1427

Παρακάτω παρατίθενται τα διαγράμματα που προέκυψαν κατά τον προσδιορισμό των IC<sub>50</sub>.



**Εικόνα 38:** Καμπύλη της % αναστολής της δραστηκότητας του ενζύμου ως συνάρτηση της συγκέντρωσης του εκχυλίσματος **Ξ3 ρόδι** και υπολογισμός της  $IC_{50}$ .

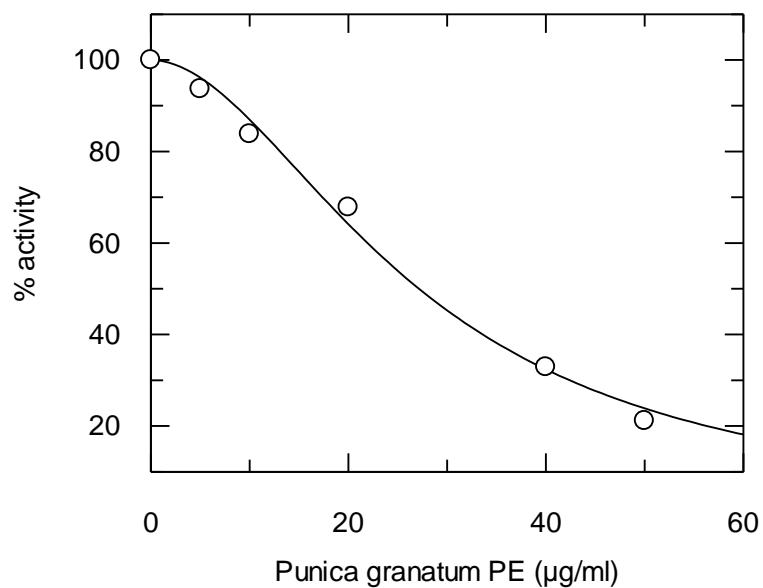
Parameter	Value	Std. Error
$IC_{50}$	8,6686	0,2122



**Εικόνα 39:** Καμπύλη της % αναστολής της δραστηκότητας του ενζύμου ως συνάρτηση της συγκέντρωσης του εκχυλίσματος **ΠΛ ρόδι** και υπολογισμός της  $IC_{50}$ .

Parameter	Value	Std. Error
$IC_{50}$	11,0516	0,7734





**Εικόνα 40:** Καμπύλη της % αναστολής της δραστηριότητας του ενζύμου ως συνάρτηση της συγκέντρωσης του εκχυλίσματος **ΠΕ ρόδι** και υπολογισμός της  $IC_{50}$ .

Parameter	Value	Std. Error
$IC_{50}$	27,1553	1,1427

**7<sup>ο</sup> ΜΕΡΟΣ**  
**ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ**

Η παρούσα διατριβή αποτελεί μέρος της γενικότερης έρευνας που διεξάγεται στο *εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας* ως προς την ανασταλτική επίδραση φυτικών εκχυλισμάτων έναντι της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Η βιοχημική μελέτη της GP στοχεύει στην κατανόηση της μοριακής βάσης της αναγνώρισης αναστολέων από το ένζυμο και το σχεδιασμό νέων υπογλυκαιμικών παραγόντων για τη θεραπεία του ΣΔτ2.

Για να εκτιμηθεί η ανασταλτική ικανότητα των εκχυλισμάτων ροδιού (*Punica Granatum*) πραγματοποιήθηκαν κινητικά πειράματα με τη φωσφορυλάση b του γλυκογόνου από μύες κουνελιού (RMGPb), προς τη κατεύθυνση σύνθεσης του γλυκογόνου, *in vitro*. Η κινητική μελέτη έδειξε ότι ορισμένα από αυτά τα εκχυλίσματα παρουσιάζουν μείωση της δραστηριότητας του ενζύμου κατά 50% ( $IC_{50}$ ), σε σημαντικά χαμηλές συγκεντρώσεις. Τα εκχυλίσματα ροδιού που μελετήθηκαν δείχνουν ικανά να αναστείλουν τη GPb, με τον αναστολέα  $\Xi 3$  να εμφανίζει αναστολή με  $IC_{50}=8,67 \pm 0,21 \mu g/mL$ , και να αποτελεί το πλέον ισχυρό βιοενεργό από αυτά τα εκχυλίσματα για να αναστείλει τη γλυκογονόλυση, μιας και η τιμή της  $IC_{50}$  είναι μικρότερη των  $10 \mu g/mL$ . Ο αναστολέας ΠΛ βρέθηκε να έχει  $IC_{50}=11,05 \pm 0,77 \mu g/mL$ , γεγονός που δηλώνει επίσης ανασταλτική δράση έναντι της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (GPb) σε σημαντικά χαμηλή συγκέντρωση [Kantsadi A.L. et al., 2014]. Ο ΠΕ από την άλλη πλευρά, βρέθηκε να εμφανίζει  $IC_{50}=27,15 \pm 1,14 \mu g/mL$ , γεγονός που δηλώνει ότι απαιτείται υψηλότερη συγκέντρωση, σχεδόν τριπλάσια του  $\Xi 3$ , για αναστολή του ενζύμου, καθιστώντας το συγκεκριμένο φυτικό εκχύλισμα ροδιού έναν επίσης ικανό αναστολέα, με ασθενέστερη όμως δράση. Ο λόγος είναι ότι για την εν δυνάμει χρήση ενός εκχυλίσματος σε ένα λειτουργικό τρόφιμο, έναντι της υπεργλυκαιμίας στη θεραπεία του ΣΔτ2, η συγκέντρωσή του για την αναστολή του ενζύμου της GP θα πρέπει να είναι όσο το δυνατόν πιο μικρή.

Η μετέπειτα εφαρμογή μεθόδων κρυσταλλογραφίας, των παραπάνω εκχυλισμάτων, για την ανάλυση της 3D δομής συμπλόκων ενζύμου-αναστολέα, σε υψηλή ευκρίνεια, θα μας βοηθήσει να ταυτοποιήσουμε τις βιοδραστικές ουσίες αυτών των εκχυλισμάτων καθώς και τα κέντρα σύνδεσής τους στο ένζυμο, με αποτέλεσμα την αναστολή του. Τέλος, με τη μέθοδο της κρυσταλλογραφίας θα μπορούσαμε να μελετήσουμε το δίκτυο των αλληλεπιδράσεων που αναπτύσσονται μεταξύ της πρωτεΐνης και των εκχυλισμάτων και να οδηγηθούμε στο σχεδιασμό ενώσεων υψηλής συγγενείας και ρυθμιστικής ικανότητας στην ισορροπία αποικοδόμησης και σύνθεσης του γλυκογόνου στο ΣΔτ2, όμως απαιτούνται και περαιτέρω μελέτες *in vivo* για επιβεβαίωση.

## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

1. Δασκαλάκη Α. Ελένη. (2009). Σχεδίαση, Ανάπτυξη και In silico Συγκριτική Αξιολόγηση Ελεγκτών Κλειστού Βρόχου για Άτομα με Σακχαρώδη Διαβήτη Τύπου 1. ΕΜΠ.
2. Γεωργάτσος Ι.Γ. (2005). *Εισαγωγή στη βιοχημεία*. Έκδοση 6<sup>η</sup>. Εκδόσεις Γιαχούδη. Θεσσαλονίκη.
3. Γεωργάτσος Ι.Γ., Γιουσάνης Τ. Α., Δ. Α. Κυριακίδης (2001). *Ενζυμολογία*. Έκδοση 4<sup>η</sup>. Εκδόσεις ΖΗΤΗ.
4. Οικονομάκος Ν.Γ. (1977). Χημική τροποποίηση ενός αλλοστερικού ενζύμου, Διδακτορική διατριβή. ΕΚΠΑ.
5. Οικονομάκος Ν.Γ. (2001). Σχεδιασμός νέων υπογλυκαιμικών φαρμάκων, *Χημικά Χρονικά*. Vol 63: 258-261.
6. Σμοκοβίτης Α. (2004). *Φυσιολογία*. Έκδοση 4<sup>η</sup>. Εκδοτικός Οίκος Αδελφών Κυριακίδη. Θεσσαλονίκη.
7. Guyton C Arthur & Hall E John (2008). *Ιατρική Φυσιολογία*. Έκδοση 11<sup>η</sup>. Επιστημονικές Εκδόσεις Παρισιάνου. Αθήνα.
8. Stryer Lubert, Berg Jeremy, Tymoczko John (2012). *Βιοχημεία*. Ενιαίος Τόμος. Έκδοση 1<sup>η</sup>. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης. Ηράκλειο.
9. Agius L., Aiston S., Hampson L., Gomez-Foix A.M., Guinovart J.J. (2001). Hepatic glycogen synthesis is highly sensitive to phosphorylase activity: evidence from metabolic control analysis. *J Biol Chem*. Vol 276: 23858– 23866.
10. Ahima R., Flier J. (2000). Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends Endocrinol Metab*. Vol 11: 327.
11. Aiston S., Hampson L., Gómez-Foix A.M., Guinovart J.J., and Agius L. (2001). Hepatic glycogen synthesis is highly sensitive to phosphorylase activity. *J. Biol. Chem*. Vol 276: 23858–23866.
12. Aiston S., Coghlan M.P., and Agius L. (2003). Inactivation of phosphorylase is a major component of the mechanism by which insulin stimulates hepatic glycogen synthesis. *Eur. J. Biochem*. Vol 270: 2773–2781.
13. American Diabetes Association (2001). Clinical practice recommendations: gestational diabetes mellitus. *Diabetes Care*. Vol 24 (Suppl. 1): 77–79.
14. American Diabetes Association (2010). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. Vol 33 (Suppl. 1): 62–69.
15. American Diabetes Association (2014). Standards of medical care in diabetes. *Diabetes Care*. Vol 37 (Suppl. 1): 14–80.
16. American Diabetes Association (2015). Classification and Diagnosis of Diabetes. *Diabetes Care*. Vol 38 (Suppl. 1): 8–16.

17. Aviram M., Dornfeld L. (2001). Pomegranate juice consumption inhibits serum angiotensin converting enzyme activity and reduces systolic blood pressure. *Atherosclerosis*. Vol 158 (Suppl. 1): 195–198.
18. Aviram M., Rosenblat M., Gaitini D., et al. (2004). Pomegranate juice consumption for 3 years by patients with carotid artery stenosis reduces common carotid intima-media thickness, blood pressure and LDL oxidation. *Clinical Nutrition*. Vol 23 (Suppl. 3):423–433.
19. Barford D., Hu S.H., Johnson L.N. (1989). The allosteric transition of glycogen phosphorylase. *Nature*. Vol 340: 609–616.
20. Bellamy L., Casas J.P., Hingorani A.D., Williams D. (2009). Type 2 diabetes mellitus after gestational diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Lancet*. Vol 373: 1773– 1779.
21. Blundell T.L., Jhoti H., Abell C. (2002). High-throughput crystallography for lead discovery in drug design. *Nature Reviews. Drug Discovery*. Vol 1.
22. Bogardus C., Lillioja S., Howard B.V., Reaven G., Mott D. (1984). Relationships between insulin secretion, insulin action, and fasting plasma glucose concentration in nondiabetic and noninsulin-dependent diabetic subjects. *J. Clin. Invest*. Vol 74: 1238– 1246.
23. Buchanan T.A. (2003). Pancreatic beta-cell loss and preservation in type 2 diabetes. *Clin. Ther*. Vol 25: (Suppl. 2): 32–46.
24. Buchanan T.A., Xiang A., Kjas S.L. et al. (2007). What is gestational diabetes. *Diabetes Care*. Vol 30: (Suppl.2): 5105–5111.
25. Cabrera O., Berman D.M., Kenyon N.S., Ricordi C., Berggren P.O., Caicedo A. (2006). The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function. *PNAS*. Vol 103: 2334–2339.
26. Carlson M.G., Snead W.L., Campbell P.J. (1993). Regulation of free fatty acid metabolism by glucagon. *J. Clin. Endocrinol. Metab*. Vol 77:11–15.
27. Cheng A.Y., Fantus I.G. (2005). Oral antihyperglycemic therapy for type 2 diabetes mellitus. *CMAJ*. Vol 172: 213–226.
28. Chiang J.L., Kirkman M.S., Laffel L.M., Peters A.L. (2014). Type 1 diabetes through the life span: a position statement of the American Diabetes Association. Type 1 Diabetes. *Diabetes Care*. Vol 37: 2034–2054.
29. Coppack S., Patel J., Lawrence V. (2001). Nutritional regulation of lipid metabolism in human adipose tissue. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. Vol 109: (Suppl. 2): 202.

30. Cori C.F. & Cori G.T. (1936). Mechanism of formation of hexosemonophosphate in muscle and isolation of a new ester. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* Vol 34: 702–705.
31. Creighton E.T. (1993). *Proteins: Structures and Molecular Properties* (2nd edition). W.H. Freeman and Company. pp. 81–83. ISBN 0-7167-2317-4.
32. Davis A., Haller M.J., Miller K., et al. (2013). Residual C-peptide in patients 3-81 years from diagnosis of T1D: A T1D Exchange Study. *Diabetes*. Vol 62: (Suppl. 1): 422.
33. DeFronzo R.A. (1992). Insulin resistance, hyperinsulinemia, and coronary artery disease: a complex metabolic web. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* Vol 20: (Suppl. 11): 1–16.
34. Diamond J. (2003). The double puzzle of diabetes. *Nature*. Vol 423: 599–602.
35. Dimitriadis G., Boutati E., Lambadiari V., et al. (2004). Restoration of early insulin secretion after a meal in type 2 diabetes: effects on lipid and glucose metabolism. *Eur. J. Clin. Invest.* Vol 34: 490–7.
36. Dimitriadis G., Mitrou P., Lambadiari V., et al. (2006). Glucose and Lipid Fluxes in the Adipose Tissue after Meal Ingestion in Hyperthyroidism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* Vol 91: 1112–8.
37. Dimitriadis G., Mitrou P., Lambadiari V., et al. (2006). Insulin action in adipose tissue and muscle in hypothyroidism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* Vol 91: 4930–7.
38. Diplock A.T., Aggett P.J., Ashwell M., Bornet F., Fern E.B., Roberfroid M.B. (1999). Scientific Concepts of Functional Foods in Europe: Consensus Document. *British Journal of Nutrition*. Vol 81 (Suppl. 1).
39. Dube S., Errazuriz I., Cobelli C., Basu R., Basu A. (2013). Assessment of insulin action on carbohydrate metabolism: physiological and non-physiological methods. *Diabet. Med.* Vol 30(Suppl. 6): 664–670.
40. Elfalleh W., Tlili N., Nasri N., et al. (2011). Antioxidant capacities of phenolic compounds and tocopherols from tunisian pomegranate (*Punica granatum*) fruits. *Journal of Food Science*. Vol 76:(Suppl. 5): 707–713.
41. Fajans S.S. et al., (2001). Molecular mechanisms and clinical pathophysiology of maturity-onset diabetes of the young. *N. Engl. J. Med.*
42. Ferraris, Ronaldo P. (2001). Dietary and developmental regulation of intestinal sugar transport. *Biochem. J.* Vol 360: 265–76.

43. Fletterick R.J., Madsen N.B. (1980). The structures and related functions of phosphorylase a, *Annu. Rev. Biochem.* Vol 49: 31–61.
44. Fonseca V.A. (2003). Management of diabetes mellitus and insulin resistance in patients with cardiovascular disease. *Am J Cardiol.* Vol 92: (Suppl. 50J-60J).
45. Food and Agriculture Organization (2003). Calculation of the Energy Content of Foods. Food energy, methods of analysis and conversion factors. *Food and Nutrition Paper 77*. ISBN 92-5-105014-7.
46. Frayn K. (2002). Adipose tissue as a buffer for daily lipid flux. *Diabetologia.* Vol 45: 1201–10.
47. Frayn K., Shadid S., Hamrani R., et al. (1994). Regulation of fatty acid movement in human adipose tissue in the postabsorptive-to-postprandial transition. *Am. J. Physiol.* Vol 266: 308–317.
48. Friesen L., Woolridge N. (2005). Overview of the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus.
49. Fuhrman B., Volkova N., Aviram M. (2010). Pomegranate juice polyphenols increase recombinant paraoxonase-1 binding to high-density lipoprotein: studies in vitro and in diabetic patients. *Nutrition.* Vol 26:(Suppl. 4): 359–366.
50. Goldberg I. (1999). Functional Foods. Designer Foods, Pharmafoods, Nutraceuticals. A Chapman & Hall Food Science Book. Aspen Publishers.
51. Hadden D.R., Hillebrand B. (1989). The first recorded case of diabetic pregnancy (Bennewitz HG, 1824, University of Berlin). *Diabetologia.* Vol 32: 625.
52. Hoet J.P., Lukens F.D. (1954). Carbohydrate metabolism during pregnancy. *Diabetes.* Vol 3: 1–12.
53. International Diabetes Federation (2011). Global Burden: Prevalence and Projections, 2011 and 2030.
54. Jensen M. (2002). Adipose tissue and fatty acid metabolism in humans. *J. R. Soc. Med.* Vol 95: (Suppl. 42): 3.
55. Johnson L.N. (1992). Glycogen phosphorylase: control by phosphorylation and allosteric effectors. *The FASEB Journal.* Vol 6 (Suppl. 6): 2274–2282.
56. Johnson L.N., Hajdu J. (1989). Synchrotron studies on enzyme catalysis in crystals. *Biophysics & Synchrotron Radiation.* Hasnain S. edition. 142–155.
57. Kahn C. Ronald et al. (2005). *Joslin's Diabetes Mellitus*. 14th edition. Lippincott Williams & Wilkins. ISBN 978-8493531836.

58. Kantsadi A.L., Apostolou A., Theofanous S, Stravodimos G.A., Kyriakis E., Gorgogietas V.A., Chatzileontiadou D.S.M., Pegiou K., Skamnaki V.T., Stagos D., Kouretas D., Psarra A-M.G., Haroutounian S.A., Leonidas D.D., (2014). Biochemical and biological assessment of the inhibitory potency of extracts from vinification byproducts of *Vitis vinifera* extracts against glycogen phosphorylase. *Food and Chemical Toxicology. Elsevier*.
59. Kashyap S., Belfort R., Gastaldelli A., Pratipanawatr T., Berria R., Pratipanawatr W., et al. (2003). A sustained increase in plasma free fatty acids impairs insulin secretion in nondiabetic subjects genetically predisposed to develop type 2 diabetes. *Diabetes*. Vol 25 (Suppl.10): 2461–74.
60. Kasvinsky P.J, Fletterick R.J, Madsen N.B. (1981). Regulation of the dephosphorylation of glycogen phosphorylase a and synthase b by glucose and caffeine in isolated hepatocytes. *Can. J. Biochem*. Vol 59: 387–395.
61. Khan A.H., Pessin J.E. (2002). Insulin regulation of glucose uptake: a complex interplay of intracellular signalling pathways. *Diabetologia*.
62. Kosmopoulou, M.N., Leonidas, D.D., Chrysina, E.D., Eisenbrand, G., and Oikonomakos, N.G. (2005) Indirubin-3'-aminooxy-acetate inhibits glycogen phosphorylase by binding at the inhibitor and the allosteric site. Broad specificities of the two sites. *Letters in Drug Design & Discovery*, in press.
63. Kristiansen M., Andersen B., Iversen L.F., Westergaard N. (2004). Identification, synthesis, and characterization of new glycogen phosphorylase inhibitors binding to the allosteric AMP site. *J. Med. Chem*. Vol 47: 3537–3545.
64. Kurukulasuriya R., Link J.T., Madar D.J., Pei Z., Richards S.J., Rohde J.J., Souers A.J., Szczepankiewicz B.G. (2003). Potential drug targets and progress towards pharmacologic inhibition of the hepatic glucose production. *Current Medicinal Chemistry*. Vol 10: 123–153.
65. Lansky EP., Newman RA. (2007). *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. *Journal of Ethnopharmacology*. Vol 109: (Suppl. 2): 177–206.
66. Lee C.J., Chen L.G., Liang W.L., Wang C.C. (2010). Anti-inflammatory effects of *Punica granatum* Linne in vitro and in vivo. *Food Chemistry*. Vol 118: (Suppl. 2): 315–322.
67. Leatherbarrow R.J. (1998). Grafit version 4.06. Erithacus Software Ltd. Staines. UK.



68. Lewis S.B., Wallin J.D., Kane J.P., Gerich J.E. (1977). Effect of diet composition on metabolic adaptations to hypocaloric nutrition: comparison of high carbohydrate and high fat isocaloric diets. *Am. J. Clin. Nutr.* Vol 30:160–170.
69. Liljenquist J.E., Bomboy J.D., Lewis S.B., Sinclair-Smith B.C., Felts P.W., Lacy W.W. et al. (1974). Effects of glucagon on lipolysis and ketogenesis in normal and diabetic men. *The Journal of Clinical Investigation.* Vol 53 (Suppl.1): 190–7.
70. Liu Z., Barrett E. (2002). Human protein metabolism: its measurement and regulation. *Am. J. Physiol.* Vol 283: 105.
71. Martin J.L., Johnson L.N., Withers S.G. (1998). Comparison of the binding of glucose and glucose-1-phosphate derivatives to T state glycogen phosphorylase b. *Biochemistry.* Vol 29: 10745–10757.
72. Matthaiou M.C., Goutzourelas N., Stagos D., Sarafoglou E., Jamurtas A., Koulocheri S.D, et al. (2014). Pomegranate juice consumption increases GSH levels and reduces lipid and protein oxidation in human blood. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association.*
73. McArdle W.D., Katch F.I., Katch V.L. (2000). Essentials of Exercise Physiology. Τόμος Ι, Έκδοση 2η. Ιατρικές Εκδόσεις Πασχαλίδης Π.Χ.
74. McCormack J.C., Westergaard N., Kristiansen M., Brand C.L., Lau J. (2001). Pharmacological approaches to inhibit endogenous glucose production as a means of anti-diabetic therapy. *Curr. Pharm. Des.* Vol 7: 1451–1474.
75. McLaughlin P.J., Stuart D.I., Klein H.W., Oikonomakos N.G., Johnson L.N. (1984). Substrate-cofactor interactions for glycogen phosphorylase b: a binding study in the crystal with heptenitol and heptulose-2-P. *Biochemistry.* Vol 23: 5862–5873.
76. Melpidou A.E., Oikonomakos N.G. (1983). Effects of glycose-6-P on the catalic and structural properties of glycogen phosphorylase a. *FEBS.* Vol 154: 105–110.
77. Monod J., Changeux J.P., Jacob F. (1963). Allosteric Proteins and Cellular Control Systems. *J. Mol. Biol.* Vol 6: 306–329.
78. Monod J., Wyman J., Changeux JP. (1965). On the nature of allosteric transitions: a plausible model. *J. Mol. Biol.* Vol 12: 88–118.
79. Morrish N.J., Wang S.L., Stevens L.K., Fuller J.H., Keen H. (2001). Mortality and causes of death in the WHO Multinational Study of Vascular Disease in Diabetes. *Diabetologia.* Vol 44 (Suppl. 2): 14–21.
80. Morton J.F. (1987). Pomegranate, *Punica granatum* L. Fruits of Warm Climates. Purdue New Crops Profile. pp. 352–5.

81. Najjar S. (2001). Insulin Action: Molecular Basis of Diabetes. *Encyclopedia of Life Sciences* (John Wiley & Sons).
82. Nolan C.J., Damm P., Prentki M., (2011). Type 2 diabetes across generations: from pathophysiology to prevention and management. *Lancet*. Vol 378 (9786):169–81.
83. No-Seong Kwak, Jukes D.J., (1999). Functional Foods. Part 1: the development of a regulatory concept. *Food Control*. Vol 12 (Suppl. 2): 99–107.
84. No-Seong Kwak, Jukes D.J. (1999). Functional Foods. Part 2: the impact on current regulatory terminology. *Food Control*. Vol 12 (Suppl.2): 109–117.
85. Oikonomakos N.G. (2002). Glycogen phosphorylase as a molecular target for type 2 diabetes therapy. *Curr. Protein Pept. Sci.* Vol 3: 561–586.
86. Oikonomakos N.G., Acharya K.R., Johnson L.N. (1992). Post-Translational Modifications of Proteins. Harding J.J. & Crabbe M.J. C. eds. *CRC Press Inc. Boca Raton*. Florida. 81–127.
87. Oikonomakos N.G., Kosmopoulou M., Zographos S.E., Leonidas D.D., Chrysina E.D., Somsak L., Nagy V., Praly J.P., Docsa T., Toth B., Gergely P. (2002). The Binding of N-acetyl-N'-b-D-glucopyranosyl urea and N-benzoyl-N'-b-D-glucopyranosyl urea to glycogen phosphorylase b. Kinetic and crystallographic studies. *Eur. J. Biochem*. Vol 269: 1684–1696.
88. Oikonomakos N.G., Schnier J.B., Zographos S.E., Skamnaki V.T., Tsitsanou K.E., Johnson L.N. (2000a). Flavopiridol inhibits glycogen phosphorylase by binding at the inhibitor site. *J. Biol. Chem*. Vol 275: 34566–34573.
89. Oikonomakos N.G., Skamnaki V.T., Tsitsanou K.E., Gavalas N.G., Johnson L.N. (2000b). A new allosteric site in glycogen phosphorylase b as a target for drug interactions. *Structure*. Vol 8: 575–84.
90. Oikonomakos N.G., Somsak L., Opin C. (2008). *Invest. Drugs*. Vol 9: 379.
91. Orskov C., Holst J.J., Poulsen S.S., Kirkegaard P. (1987). Pancreatic and intestinal processing of proglucagon in man. *Diabetologia*. Vol 30 (Suppl.11): 874–81.
92. Patzelt C., Schiltz E. (1984). Conversion of proglucagon in pancreatic alpha cells: the major endproducts are glucagon and a single peptide, the major proglucagon fragment that contains two glucagon-like sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* Vol 81:5007–5011.

93. Rath V.L., Amimirati M., Danley D.E., Ekstrom J.L., Gibbs E.M., Hynes T.R., Mthinowetz A.M., McPherson R.K., Olson T.V., Treadway J.L. and Hoover D.J. (2000). Human liver glycogen phosphorylase inhibitors bind at new allosteric site. *Chemistry and Biology*. Vol 7 (Suppl. 9): 677–682.
94. Rath V.L., Newgard C.B., Sprang S.R., Goldsmith E.J. and Fletterick R.J. (1987). Modeling the biochemical differences between rabbit muscle and human liver phosphorylase. *Proteins Struct. Funct. Genet.* Vol 2: 225–235.
95. Reece J., Campbell N. (2002). *Biology*. San Francisco: Benjamin Cummings. ISBN 0-8053-6624-5.
96. Rizza R.A. (2010). Pathogenesis of fasting and postprandial hyperglycemia in type 2 diabetes: implications for therapy. *Diabetes*. Vol 59: 2697–2707.
97. Roglic G., Unwin N., Bennett P.H., Mathers C., Tuomilehto J., Nag S. et al. (2005). The burden of mortality attributable to diabetes: realistic estimates for the year 2000. *Diabetes Care*. Vol 28 (Suppl. 9): 2130–2135.
98. Saheki S., Takeda A., Shimazu T. (1985). Assay of inorganic phosphate in the mild pH range, suitable for measurement of glycogen phosphorylase activity. *Anal. Biochem.* Vol 148: 277–281.
99. Schubert SY., Lansky EP., Neeman I. (1999). Antioxidant and eicosanoid enzyme inhibition properties of pomegranate seed oil and fermented juice flavonoids. *Journal of Ethnopharmacology*. Vol 66: (Suppl. 1): 11–17.
100. Singh R.P., Chidambara Murthy K.N., Jayaprakasha G.K. (2002). Studies on the Antioxidant Activity of Pomegranate (*Punica granatum*) Peel and Seed Extracts Using in Vitro Models. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol 50 (Suppl. 1): 81–6.
101. Somsak L., Czifrak K., Toth M., Bokor E., Chrysina E.D., Alexacou K.M., Hayes J.M., Tiraidis C., Lazoura E., Leonidas D.D., Zographos S.E., Oikonomakos N.G. (2008). New Inhibitors of Glycogen Phosphorylase as Potential Antidiabetic Agents. *Curr. Med. Chem.* Vol 15: 2933–2983.
102. Sprang S.R., Goldsmith E.J., Fletterick R.J., Withers S.G., Madsen N.B. (1982). Catalytic site of glycogen phosphorylase: Structure of the T state and specificity for  $\alpha$ -D-glucose. *Biochemistry*. Vol 21: 5364–5371.

103. Steiner D.F., Oyer P.E. (1967). The biosynthesis of insulin and a probable precursor of insulin by a human islet cell adenoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* Vol 57 (Suppl. 2): 473–80.
104. Steiner D.F., Philipson L.H. (2009). Insulin Biosynthesis, Secretion, Structure, and Structure-Activity Relationships. *NCBI*.
105. Tao Z., Shi A., Zhao J. (2015). Epidemiological Perspectives of Diabetes. *Cell. Biochem. Biophys.*
106. The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. (1997). Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*. Vol 20: 1183–1197.
107. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism (2001). Physiological levels of glucagon do not influence lipolysis in abdominal adipose tissue as assessed by microdialysis. *JCEM*. Vol 86 (Suppl. 5): 2085–9.
108. Thrower S.L., Bingley P.J. (2011). Prevention of type 1 diabetes. *Br. Med. Bull.* Vol 99 (Suppl.1): 73–88.
109. Treadway J.L., Mendys P., Hoover D.J. (2001). Glycogen phosphorylase inhibitors for treatment of type 2 diabetes mellitus. *Expert. Opin. Investig. Drugs*. Vol 10: 439–454.
110. Viuda-Martos M., Fernández-Lóaez J., Pérez-álvarez JA. (2010). Pomegranate and its many functional components as related to human health: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. Vol 9: (Suppl. 6): 635–654.
111. Wang S., Wei W., Zheng Y., Hou J., Dou Y., Zhang S., Luo X., Cai X. (2012). The role of insulin C-peptide in the coevolution analyses of the insulin signaling pathway: a hint for its functions. *PMC*. Vol 7(Suppl.12): e52847.
112. Whiteman E.L., Cho H., Birnbraum M.J. (2002). *Trends in endocrinology and metabolism*. Vol 13: 444–451.
113. Wilcox Gisela (2005). Insulin and Insulin Resistance. Articles from *The Clinical Biochemist Reviews*. Vol 26(Suppl.2): 19–39.
114. Wild S., Roglic G., Green A., Sicree R., King H. (2004). Global Prevalence of Diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*. Vol 27/5.
115. Witters L. A., Avruch J. (1978). Insulin regulation of hepatic glycogen synthase and phosphorylase. *Biochemistry*. Vol 17: 406–410.
116. Woods S.C., Lutz T., Geary N., Langhans W. (2006). Pancreatic signals controlling food intake; insulin, glucagon and amylin. *Phil. Trans. R. Soc. B*. Vol 361: 1219–1235.

117. World Health Organization (1999). Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Geneva. (WHO/NCD/NCS/99.2).
118. World Health Organization (2011). Global status report on noncommunicable diseases 2010. Geneva.
119. World Health Organization (2012). Global data on visual impairments 2010. Geneva.
120. World Health Organization (2013). *Diabetes Fact sheet* N°312. October 2013. Retrieved 25 March 2014.
121. World Health Organization (2014). *Diabetes Programme Diabetes Action Online*.
122. World Health Organization (2014). Global Health Estimates: Deaths by Cause, Age, Sex and Country, 2000-2012. Geneva.
123. World Health Organization (2014). *About diabetes*. Retrieved 4 April 2014.
124. Zunino S., (2009). Type 2 diabetes and glycemic response to grapes or grape products. *J. Nutr.* Vol 139: 1794–1800.